

**Biochemische Untersuchungen über den Einfluß von
Kulturmedien mit erhöhtem NaCl- und Glucose-Gehalt
auf Ehrlich — Ascites — Tumorzellen: Analyse der
Glykolyserate, des Sauerstoffverbrauchs und des Lipid-
spektrums der Gesamtzellen und der daraus isolierten
Plasmamembranen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von
Walter Manske
aus Olschan/Olmütz

Marburg/Lahn 1975

**Biochemische Untersuchungen über den Einfluß von
Kulturmedien mit erhöhtem NaCl- und Glucose-Gehalt
auf Ehrlich — Ascites — Tumorzellen: Analyse der
Glykolyserate, des Sauerstoffverbrauchs und des Lipid-
spektrums der Gesamtzellen und der daraus isolierten
Plasmamembranen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

Walter Manske
aus Olschan/Olmütz

Marburg/Lahn 1975



Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg/L.
als Dissertation angenommen am 15. 12. 1975

Tag der mündlichen Prüfung: 09. 01. 1976

Dekan:	Prof. Dr. K. -A. Seitz
Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Schachtschabel
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. D. Werner

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. D. Schachtschabel

im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Marburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. D. Schachtschabel danke ich für die großzügige Förderung der Untersuchungen und für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. H. Egge danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Lipidanalysen.

Frau Dr. R. Marx danke ich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Für technische Unterstützung danke ich Frau H. Bonner, Fräulein U. Cyriax und Frau H. Kolitsch.

Meiner Frau S. Manske danke ich für die Anfertigung der Reinschrift dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen.....	5
1. <u>Einleitung und Fragestellung</u>	7
2. <u>Material und Methoden</u>	15
2.1. Zellmaterial.....	15
2.1.1. Zellzüchtung.....	15
2.1.1.1. Kulturmedium	15
2.1.1.2. Kulturflaschen.....	17
2.1.1.3. Anzüchtung von Ehrlich-Ascites-in vivo- Zellen (ED-in vivo-Z.).....	17
2.1.2. Adaptation an hypertones Nährmedium.....	17
2.1.2.1. Adaptation an erhöhte NaCl-Konzentration.....	17
2.1.2.2. Adaptation an erhöhte Glucose-Konzentration.....	18
2.1.3. Aufarbeitung der Zellen für O ₂ -Messungen, RNA-, DNA-Bestimmung und Proteinbestimmung.....	18
2.1.4. Bestimmung der Zellzahl, Anteil toter Zellen.....	19
2.2. Protein-, DNA-, RNA-Bestimmung, Laktat- bildung.....	20
2.2.1. Bestimmung des Proteingehalts.....	20
2.2.2. DNA-Bestimmung.....	20
2.2.3. RNA-Bestimmung.....	21
2.2.4. Laktat-Bestimmung.....	21
2.3. Enzymbestimmung.....	22
2.4. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs.....	30
2.5. Bestimmung der Glycosaminoglycane.....	31
2.6. Membranisolierung, Reinheitskriterien von Plasmamembranen.....	35
2.6.1. Membranisolierung.....	35
2.6.2. Reinheitskriterien von Plasmamembranen.....	39
2.7. Lipidanalysen	42
2.7.1. Aufarbeitung der Kulturen.....	43
2.7.1. DC-Bestimmung der Lipide.....	44

3.	<u>Ergebnisse</u>	46
3.1.	Wachstumsparameter.....	46
3.2.	Energiestoffwechsel.....	49
3.2.1.	Sauerstoffverbrauch.....	49
3.2.2.	Laktatbildung.....	50
3.2.3.	Einfluß unterschiedlicher Inkubationsmedien auf den Sauerstoffverbrauch.....	50
3.3.	Enzymaktivitäten von ED-0,15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen.....	62
3.4.	Glycosaminoglycane.....	64
3.5.	Isolierung von Plasmamembranen.....	67
3.6.	Lipidanalysen.....	73
3.6.1.	Bestimmung des Lipidverteilungsmusters von Zellen und Plasmamembranen.....	73
3.6.1.1.	Bestimmung der Hauptklassen der Membranlipide..	76
3.6.2.	Verteilung der Fettsäuren in den Gesamtlipiden von Zellen.....	78
3.6.2.1.	Verteilung der Fettsäuren der Plasmamembran- lipide.....	80
4.	<u>Diskussion</u>	82
5.	<u>Zusammenfassung</u>	100
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	105

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5' -diphosphat
Ald	Aldolase
AMP	Adenosin-5' -monophosphat
ATP	Adenosin-5' -triphosphat
BME	Basalmedium (Eagle' s)
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
E. S. -Lsg.	Earles Salz-Lösung
FDP,	
F _{1,6} -P ₂	Fructose-1, 6-Diphosphat
F-6-P	Fructose-6-Phosphat
F-6-PK	Fructose-6-Phosphat-Kinase
GAG	Glycosaminoglycan
GAP	Glycerinaldehyd-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDH	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
Glu-DH	Glutamat-Dehydrogenase
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
HIM	Hexose-Phosphat-Isomerase
HK	Hexokinase
ICDH	Isocitrat-Dehydrogenase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
NAD(H)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (red.)
NADP(H)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (red.)
OAA	Oxalacetat

s. Pase	saure Phosphatase
PCA	Perchlorsäure
PEP	Phospho-Enol-Pyruvat
6-PGDH	6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase
PGK	Phospho-Glycerat-Kinase
P _i	anorg. Phosphat
3-PGS	3-Phospho-Glycerin-Säure
PK	Pyruvat -Kinase
TCA	Trichloressigsäure
TIM	Triose-Phosphat-Isomerase
TM	Tris-Mg- Stammlösung
TRA	Triäthanolamin
TRAP	Triäthanolamin-Puffer

ED-0,15-Zellen	: Ehrlich's-hyperdiploide-Tumorzellen, in BME mit 0,15 M NaCl-Lösung kultiviert.
ED-0,35-Zellen	: Ehrlich's-hyperdiploide-Tumorzellen, in BME mit 0,35 M NaCl-Lösung (NaCl-adaptierte Zellen) kultiviert.
ED-in vivo-Zellen	: Ehrlich's-hyperdiploide-Tumorzellen, die intra-peritoneal in Mäuse inoculiert wurden, und dort in vivo gezüchtet wurden.
EG-50-Zellen	: Ehrlich's-hyperdiploide-Tumorzellen, in BME mit 50 mg/ml Glucose kultiviert.
EG-65-Zellen	: Ehrlich's-hyperdiploide-Tumorzellen, in BME mit 65 mg/ml Glucose kultiviert.

1. Einleitung und Fragestellung

Erste Studien über das Zellverhalten außerhalb eines Organismus wurden von ARNOLD (1887), RINGER (1880; 1883 ; 1886;1895) LOCKE (1895 a,b; 1900) und TYRODE (1910) durchgeführt.

ARNOLD isolierte Leukozyten aus dem dorsalen Lymphsack eines Frosches und beobachtete unter dem Mikroskop deren Zellbewegungen über einen Zeitraum von 4 bis 5 Tagen; als Nährmedium diente ihm die Lymphflüssigkeit der Elterntiere. HARRISON machte 1906 bis 1908 umfangreiche Untersuchungen an lebenden Nervenfasern von Fröschen unter in vitro-Bedingungen. HARRISON's Mitarbeiter WARREN und Margaret LEWIS wiesen auf die Notwendigkeit hin, zum Studium von Lebensvorgängen Zellen in einem definierten und kontrollierten Nährmedium zu halten (LEWIS und LEWIS, 1911 a,b; 1912). Durch Veränderungen in der Tonizität und der Salzzusammensetzung im Kulturmedium wurden das Wachstum von Zellen und isolierten Geweben verändert (CARREL und BORROWS, 1911; LOEB und FLEISHER, 1919; EBELING, 1914). Diese frühen Studien wurden durchgeführt, um herauszufinden, welche physikalisch-chemischen Faktoren die Wachstumsrate von Zellen verändern (CARREL und BORROWS, 1911), und welche Faktoren die Proliferation von Geweben beeinflussen.

Die ursprünglichen, sogenannten natürlichen Nährmedien mit ihren komplexen biologischen Bestandteilen (Embryonenextrakte, Hefepressaft) wurden allmählich durch chemisch definierte Substanzen ersetzt.

Der Nährstoffbedarf und die Kulturbedingungen vieler Zellarten wurden vor allem in den letzten 20 Jahren intensiv untersucht. WEYMOUTH beschrieb 1965 mehr als 50 verschiedene synthetische Nährmedien, die meist empirisch ermittelt waren und für fast jede Zellart abgewandelte Komponenten enthielten. Nährmedien enthalten als nieder-

molekulare Komponenten: Salze, Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren und Nucleinsäurevorstufen, außerdem sind Vitamine und, insbesondere in Nährmedien für Nicht-Tumorzellen, häufig Serum enthalten.

Für ihr Wachstum benötigen in vitro gezüchtete Zellen als anorganische Ionen, neben Spurenelementen: Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium, sowie Chlorid-, Sulfat- und Phosphat-Ionen. Veränderungen in der Elektrolytzusammensetzung führen zu einem veränderten Wachstum der Zellen (PIRT und THACKERAY, 1964 a,b; WHITFIELD, PERRIS und YOUNG, 1968; YOUNG und MORTON, 1970; SCHACHTSCHABEL und FOLEY, 1972; SCHACHTSCHABEL, 1969, 1972). Eine Konzentration von 85 bis 115 mM Na^+ und 1 bis 10 mM K^+ wurde als optimal für das Wachstum von Mäusefibroblasten und HeLa-Zellen (EAGLE, 1956) angesehen. Für die Zellproliferation und die DNA-Synthese von HeLa-Zellen beträgt die optimale NaCl-Konzentration 100 bis 130 mM (STUBBLEFIELD und MUELLER, 1960). Bei einer Konzentration von über 160 mM NaCl erhielten STUBBLEFIELD und MUELLER eine deutliche Hemmwirkung der DNA-Synthese, während der RNA-, Protein- und Phospholipidgehalt erhöht waren; eine starke Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit mit Zellschädigung erfolgte bei 280 mM NaCl.

Ein Wachstum von in vitro-Zellen in hoher NaCl-Konzentration ist jedoch möglich; so gelang es SCHACHTSCHABEL und FOLEY (1972), Ehrlich-Ascites-Tumorzellen an eine NaCl-Konzentration von 450 mM zu adaptieren, ohne daß die Zellen irreversibel geschädigt wurden.

Durch Veränderungen des Ionenmilieus gelang es, Atmung und Glycolyse und damit den Energiestoffwechsel von in vitro gewachsenen Zellen zu beeinflussen: Der Einfluß von K^+ -Ionen war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, so fanden GORDON und DE HARTOG (1968), POOLE und MITARB. (1971), COE und GREENHOUSE (1973), GREENHOUSE und COE (1973), SCHOLNICK und MITARB. (1973) und ORR und MITARB. (1971), daß K^+ -Ionen stimulierend auf die

Glycolyse wirken, LEVINSON und HEMPLING (1967) fanden eine K^{+} -Stimulierung der Atmung.

BYGRAVE (1966) beschrieb eine kompetitive Hemmung der Pyruvatkinase und damit der Glycolyse durch Ca^{++} -Ionen (Kompetition mit K^{+} -Ionen). Neben dem Einfluß von Elektrolyten auf den Energiestoffwechsel spielen Sauerstoff und Glucose, die Substrate der Atmung und Glycolyse für deren Regulierung eine wesentliche Rolle.

Der Einfluß von Sauerstoff auf den Energiestoffwechsel beschrieb schon PASTEUR im Jahre 1876. Er fand, daß der Glucoseverbrauch einer anaerob gehaltenen Hefesuspension abnahm, nachdem die Zellen belüftet wurden. WARBURG (1926b) nannte diese Hemmung der Glycolyse durch gesteigerte Atmung "Pasteur-Effekt". Unter energetischen Gesichtspunkten ist der Pasteur-Effekt sehr sinnvoll, zumal bei der Atmung aus einem Mol Glucose 38 Mol ATP, bei der Glycolyse dagegen aus 1 Mol Glucose nur 2 Mol ATP gebildet werden. Bei Normalgewebe wird deshalb die Glycolyse, von Ausnahmen abgesehen, durch die Atmung vollständig unterdrückt.

Tumorzellen, die auch unter aeroben Bedingungen hohe Glycolyseraten aufweisen, zeigten ebenfalls einen Pasteur-Effekt, wenn auch weniger ausgeprägt (WU und RACKER, 1959 a; GREGG und MITARB., 1968). Mehrere Theorien versuchten den Pasteur-Effekt zu erklären: So wurde angenommen, daß Sauerstoff SH-Enzyme der Glycolyse in ihrer Aktivität hemmt (LIPMANN, 1934), oder Enzymstrukturen glycolytischer Enzyme verändert werden (DIXON und HOLMES, 1935). Eine Hemmung der Glycolyse durch Limitierung von anorganischem Phosphat (P_i) und ADP (LIPMANN, 1933; RACKER, 1956; WU und RACKER, 1959b) durch verstärkte ATP-Bildung erschien als Erklärung für den Pasteur-Effekt am wahrscheinlichsten.

Den umgekehrten Effekt, nämlich Hemmung der Atmung in Gegenwart von Glucose, beschrieb CRABTREE (1929). CRABTREE

hatte an Schnitten von Sarcoma- und Carcinoma-Geweben festgestellt, daß Glucose-Zusatz zu einer verminderten Atmung führte. Dieser "Crabtree-Effekt" wurde sowohl an neoplastischem als auch an nicht-neoplastischem Gewebe gefunden. Untersuchungen über den Crabtree-Effekt erhielten neuen Aufschwung, als KUN (1951) und EL' TSINA und SEITZ (1951) einen Crabtree-Effekt an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen entdeckten. Ehrlich-Ascites-Tumorzellen werden heute als "Standardzellen des Crabtree-Effekts" angesehen. Der Begriff "Crabtree-Effekt" wird auch dann verwendet, wenn eine Atmungshemmung durch andere metabolisierbare Kohlenhydrate als Glucose auftritt (IBSEN, 1961).

Glucose dient in vivo und in vitro den meisten Zellen als Energiequelle. Fast alle künstlichen Nährmedien enthalten aus diesem Grund Glucose in einer Konzentration von 1 mg/ml. Glucose kann ersetzt werden durch Fructose, Mannose, Galaktose, Glucose-1-Phosphat, Glucose-6-Phosphat oder Maltose, nicht jedoch durch Saccharose (MORGAN und MORTON, 1960). Glucose und andere Kohlenhydrate regulieren den Energiestoffwechsel sowohl durch Stimulierung der Glykolyse (JONES und BONTING, 1956; WU und RACKER, 1959a; BAILEY und GEY, 1959; RACKER, 1965; GREGG, 1968; MORGAN und ENG, 1970), als auch durch Hemmung der Atmung (CRABTREE, 1929; KUN und MITARB., 1951; CLOWES und KELTCH, 1954; BRIN und MC KEE, 1956; SEELICH und MITARB., 1956; RACKER, 1956; IBSEN, 1958; JAJARAMAN und MITARB., 1966).

Eine endgültige Deutung des Crabtree-Effekts kann heute noch nicht gegeben werden (IBSEN, 1961; KOOBS, 1972). Eine Kompetition zwischen Atmung und Glykolyse wie BELITZER (1936) beschrieben hatte, kann nicht als einzige Erklärung gelten (IBSEN, 1961). Eine Abnahme der P_i -Konzentration während der Glykolyse wurde beschrieben (IBSEN und COE, 1958 ; HESS und CHANCE, 1959; WU und RACKER, 1959b; WU, 1965) und durch Phosphat-Zugabe konnte der

Crabtree-Effekt aufgehoben werden (BRIN und MC KEE, 1956; WU und RACKER, 1959 a); jedoch kam es zu keiner zusätzlichen Stimulierung der Atmung in Gegenwart hoher Phosphat-Konzentrationen ($> 5 \text{ mM}$) (IBSEN und COE, 1960).

PACKER und GOLDER (1960) konnten Strukturveränderungen an der Mitochondrienmembran bei einem erhöhten intramitochondrialen ATP-Gehalt und einem erhöhten ADP-Gehalt im Cytoplasma nachweisen. Der Anstieg von ADP im Cytoplasma bei erhöhter Glucose-phosphorylierung bzw. ein ATP-Anstieg in den Mitochondrien führte nach den Befunden von GATT und RACKER (1959) zu einem veränderten Austausch der Nucleotide aufgrund von Veränderungen der Permeabilitätseigenschaften von Mitochondrienmembranen. HESS und CHANCE (1961) stellten einen erhöhten ATP-Gehalt in den Mitochondrien nach Glucoseaufnahme durch die Zellen fest. Die Kompetition um ATP/ADP könnte den Crabtree-Effekt erklären. CHANCE und HESS (1956) und IBSEN und MITARB. (1958) halten eine solche Kompetition zwischen Atmung und Glykolyse in Bezug auf die Adeninnucleotide für wahrscheinlich.

Die Dauer der Atmungshemmung hängt davon ab, wie schnell Kohlenhydrate glykolysiert werden. BRIN und MC KEE (1956) stellten fest, daß gleiche Konzentrationen von Glucose, Fructose und Mannose einen gleichen Crabtree-Effekt bewirkten; die Hemmung durch Mannose hielt über einen längeren Zeitraum an, wobei Mannose langsamer glykolysiert wurde (BRIN und MC KEE , 1956).

Eine Steigerung der Glykolyse durch Kohlenhydrate ist nur bedingt möglich: BLOCH-FRANKENTHAL und WEINHOUSE (1959) zeigten, daß eine maximale Glykolyserate bei einer Glucose-Konzentration von $0,1 \text{ mM}$ vorhanden ist. GREGG (1972) berechnete eine maximale Glykolyserate ($V_{\max}$) bei $5,56 \text{ mM}$ Glucose.

Tumorzellen verlieren nach HATANAKA und MITARB. (1970) die Fähigkeit den Einstrom exogener Glucose zu verhindern; die hohe

Glykolyserate bei Tumorzellen wurde durch den Verlust dieser Fähigkeit erklärt.

Glucose führt in hohen Konzentrationen zur Hemmung des Wachstums oder zum Tod von Zellkulturen ("Glucose-Toxizität") (JONES und BONTING, 1956; ZWARTOUW und WESTWOOD, 1958; GRAFF und MITARB., 1965; BAUGH und MITARB., 1967; BAILEY und MITARB., 1969; MORGAN und ENG, 1970). ZWARTOUW und WESTWOOD (1958) konnten in-vitro-Kulturen bei einer Glucose-Konzentration von 16 mg/ml züchten; die Wachstumsgeschwindigkeit war jedoch vermindert. GRAFF und MITARB. (1965) konnten zeigen, daß Ehrlich-Ascites-Tumorzellen auch bei niederen Glucosekonzentrationen wuchsen (1,7 µg/ml) und nur wenig Laktat dabei produzierten. Auch physiologische Konzentrationen führten zum Zelltod von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, wenn diese vorher bei niederen Glucose-Konzentrationen gezüchtet worden waren (GRAFF und MITARB., 1965).

Obwohl Glucose nach den angeführten Befunden anderer Autoren in höheren Konzentrationen toxisch auf das Zellwachstum wirkt, ist es möglich, Ascites-Tumorzellen in Gegenwart von mindestens 75 mg/ml Glucose im Nährmedium permanent in Kultur zu züchten (SCHACHTSCHABEL, unveröff. Resultate).

Die Mechanismen, die in einer Zelle Leben und Wachstum in einem hypertonen Milieu ermöglichen, sind ungeklärt. In früheren Untersuchungen von EGGE und MITARB. (1972), SCHACHTSCHABEL und KÜRSCHNER (1972), KÜRSCHNER (1971), SCHACHTSCHABEL und MITARB. (1974) und KOHEN und MITARB. (1974) mit Ascites-Tumorzellen, die an hohe NaCl-Konzentrationen (bis 450 mM) adaptiert waren, wurde eine Erhöhung des Glucoseumsatzes, des Sauerstoffverbrauchs, der ATPase-Aktivität und Veränderungen des zellulären Lipidumsatzes gefunden. Diese Befunde wurden im Sinne einer "Ankurbelung" des Energiestoffwechsels gedeutet. Es war bei diesen Ergebnissen unklar geblieben, ob die aufgetretenen Effekte

nur osmotisch bedingt waren, oder ob es sich dabei um ionenspezifische Prozesse handelte. Ungeklärt blieb weiterhin, ob diese Ionenveränderungen letztlich zu Änderungen der Struktur (und Funktion) insbesondere der Plasmamembranen geführt hatten.

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb vergleichende Untersuchungen an Zellen durchgeführt werden, die in isotonem Milieu in Kultur (in vitro) und in vivo (intraperitoneal in der Maus) bzw. in hypertonem Glucose- oder Salz-Milieu in vitro gezüchtet worden waren. Neben Bestimmungen der makromolekularen Zusammensetzung dieser Zellen (DNA, RNA und Proteingehalt) sollten Bestimmungen der Aktivitäten glykolytischer Enzyme durchgeführt werden. Ferner sollten analysiert werden: a) das Lipidmuster der Gesamtzellen bzw. der daraus isolierten Plasmamembranen; b) Aspekte des Energiestoffwechsels, wie zellulärer Sauerstoffverbrauch und Glykolyserate; Bestimmung der Aktivität glykolytischer Enzyme und der Aktivität von Enzymen des Pentosephosphatzyklus; c) Membraneigenschaften, wie osmotische Fragilität; d) die zellulären und extrazellulären Glycosaminoglycane (im Vorversuch).

Im Vordergrund stand die Frage, welche Mechanismen die Zelle befähigen, in Medien mit hypertoner NaCl- oder Glucose-Konzentration zu wachsen. Dabei sollte insbesondere eruiert werden, ob die Adaptation des Wachstums an hypertone NaCl- und Glucose-Medien mit Veränderungen des Energiestoffwechsels (z. B. verstärkter Crabtree-Effekt beim Wachstum im hypertonen Glucose-Milieu) und der Membranzusammensetzung (bezüglich der Lipide) korreliert, und wie die Zelle sich gegen hohe Glucose-Konzentrationen schützt. Neben aktiven Schutzmechanismen, z. B. Erhöhung des Energiestoffwechsels in Verbindung mit erhöhtem aktiven Transport ins Zellaußenmedium, sind Veränderungen der Plasmamembranzusammensetzung als mechanischer Schutz denkbar. Außer Membran-

veränderungen könnte eine vermehrte Ausbildung polymerer Anionen in Form von Glycosaminoglycanen auftreten. Diese könnten als Proteoglycane den Plasmamembranen aufgelagert sein und dadurch zu einer verminderten Durchlässigkeit führen.

2. Material und Methoden

2.1. Zellmaterial

Für die Untersuchungen wurden Ehrlich's hyperdiploide Ascites-Tumorzellen (ED-0,15-Zellen) verwendet. Diese Tumorzellen weisen charakteristische Marker-Chromosomen, sogenannte A- und B-Chromosomen (BAYREUTHER, 1952; MELANDER, 1963; SCHACHTSCHABEL und MITARB., 1969) auf.

2.1.1. Zellzüchtung

Die Zellen wurden von SCHACHTSCHABEL 1963 (SCHACHTSCHABEL, 1967; 1969) aus der Ascitesflüssigkeit einer CFW-Maus isoliert und seitdem permanent in vitro weitergezüchtet. Die in-vitro-Zellen wuchsen in Monolayer-Kulturen bei 37 C, ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Std.. Verbrauchtes Nährmedium wurde durch frisches, vorgewärmtes Medium unter sterilen Bedingungen ersetzt. Die zugesetzte Mediummenge richtet sich nach der Anzahl der Zellen pro Kulturflasche; auf 10^6 Zellen entfielen etwa 2 ml Medium. Um eine starke Alkalisierung zu vermeiden, wurden die Kulturen bei jedem Mediumwechsel mit einem Gasgemisch von 7 % CO_2 , 20 % O_2 und 73 % N_2 begast.

2.1.1.1. Kulturmedium

Als Nährmedium für die Zellzüchtung wurde Eagles (EAGLE, 1955) Basalmedium (BME) von der Firma Grand Island Biological Company, New York mit Earles (EARLE, 1943)-Salzen verwendet (Tab. 1).

Tab. 1 : Basalmedium (Eagle) mit Earles Salzen

Bestandteile	mg/l	Bestandteile	mg/l
NaCl	6800,0	L-Methionin	7,50
KCl	400,0	L-Phenylalanin	16,50
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	140,0	L-Threonin	24,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	200,0	L-Tryptophan	4,0
CaCl_2 (anhyd.)	200,0	L-Valin	23,50
NaHCO_3	2200,0	Biotin	1,0
Glukose	1000,0	Folsäure	1,0
L-Glutamin	292,0	Cholin	1,0
L-Arginin HCl	21,0	Nicotinsäureamid	1,0
L-Cystein	12,0	D-Ca-Pantothensäure	1,0
L-Tyrosin	18,0	Pyridoxal HCl	1,0
L-Histidin	8,0	Thiamin HCl	1,0
L-Isoleucin	26,0	Riboflavin	0,10
L-Leucin	26,0	meso-Inosit	1,80
L-Lysin	26,0	Phenolrot	10,0

zusätzlich:

a) 2,2 g NaHCO_3

b) 100 000 IE Penicillin-G-Natrium (Novo Industrie, Mainz)

zusätzlich:

a) 2,2 g NaHCO_3

b) 5,0 ml 1 N HCl

c) 100 000 IE Penicillin-G-Natrium (Novo Industrie, Mainz)

d) 135 mg Streptomycin-Sulfat (Fa. Grünenthal, Stolberg)

Die Sterilisation des Mediums erfolgte mit einer Sartorius-Filter-apparatur; die Porengröße des Filters betrug $0,2 \mu\text{m}$. Nach dem Filtrieren wurden pro Liter Medium 100 ml fötales Kalbsserum (Fa. Grand Island Biol. Comp.) zugegeben.

2.1.1.2. Kulturflaschen

Es wurden pharmazeutische 4-ounce-Flaschen der Firma Brockway Company, USA verwendet.

2.1.1.3. Anzüchtung von Ehrlich-Ascites in-vivo-Zellen (ED-in vivo)

NMRI-Mäusen (Fa. Ivanovas, Kisslegg) wurden 2×10^6 Zellen/0,2ml intraperitoneal inokuliert. Nach 5 bis 7 Tagen wurden die Zellen aus der Ascitesflüssigkeit geerntet.

2.1.2. Adaptation an hypertones Nährmedium

2.1.2.1 Adaptation an erhöhte NaCl-Konzentration

Die Isolierung und Anzüchtung von "NaCl-adaptierten Zellen" wurde von SCHACHTSCHABEL (1969) nach folgendem Schema durchgeführt:

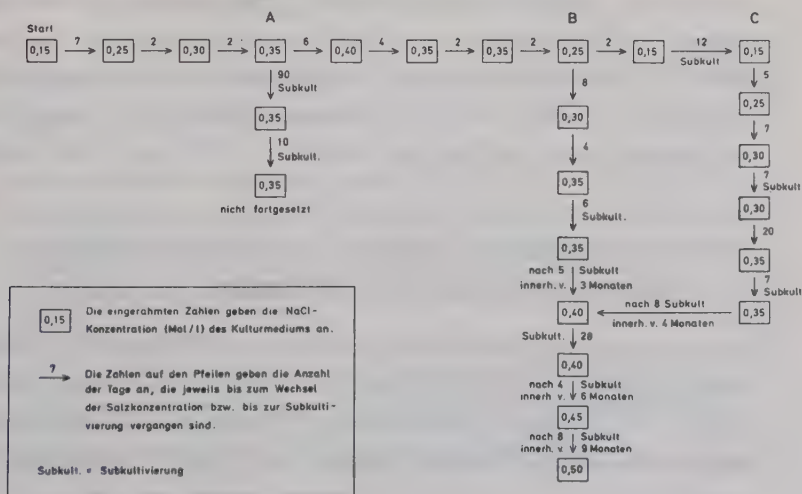


Abb. 1 : Legende s. S. 18

zu Abb. 1: Schematische Darstellung der Adaptation von Zellkulturen des Ehrlich-Ascites-Tumors an Proliferation in Nährmedium mit erhöhtem (hypertonem) NaCl-Gehalt.

Hypertone Medien wurden durch Zusatz von NaCl zum Nährmedium hergestellt. A, B und C zeigen die verschiedenen Wege, auf denen eine Proliferation von Zellen in hypertonen Medien gelang. Es wurde dabei jedes Mal vom "Start 0,15" (Zellen, welche im "Normalmedium" proliferieren) ausgegangen, und nach verschiedenen Zeiten der Salzgehalt im Nährmedium erhöht. Das Medium wurde jeweils alle 2 Tage erneuert.

2.1.2.2. Adaptation an erhöhte Glucose-Konzentration

Zunächst wurden die Zellen einige Wochen in Nährmedium mit einem Glucose-Gehalt von 25mg/ml gezüchtet; danach wurde die Glucose-Konzentration auf 50mg/ml erhöht.

Das Medium wurde an jedem zweiten Tag gewechselt. Nach mehrmaligem Mediumwechsel wurde die Glucose-Konzentration im Medium wieder auf 25mg/ml erniedrigt. Es erfolgte eine mehrmalige Subkultivierung bei der Glucose-Konzentration 25mg/ml. Danach wurde der Glucose-Gehalt auf 50 bzw. 65mg/ml (G-50 bzw. G-65) erhöht.

2.1.3. Aufarbeitung der Zellen für O₂-Messungen, RNA-, DNA-Bestimmung und Protein-Bestimmung

Wenn nicht anders beschrieben, wurden ED-0,15-Zellen mit einem Gummiwischer von der Glasfläche der Kulturflaschen mechanisch abgelöst. Vor weiterer Verwendung der Zellen wurde überschüssiges Nährmedium durch 2maliges Waschen mit Earles Salz-Lösung entfernt.

ED-in vivo-Zellen wurden in Earles Salzlösung aufgenommen, dem 20 IE/ml Heparin als Gerinnungshemmer zugesetzt waren. Die Zellen wurden vor weiterer Verwendung 2 mal mit Earles Salz bei Raumtemperatur (25 C) gewaschen. Zwischen den Waschungen wurden die Zellen jeweils 3 Min. bei 1000 g abzentrifugiert. NaCl-adaptierte bzw. Glucose-adaptierte Zellen wurden mit Earles Salz gewaschen, dem entsprechend NaCl bzw. Glucose zugesetzt war.

Nach Resuspension in Earles Salzlösung wurden aliquote Anteile für die O₂-Messung (s. S. 30), Protein- (s. S. 20), RNA- (s. S. 21) und DNA- (s. S. 20) Bestimmungen entnommen.

Die Anteile für RNA- und DNA-Bestimmungen wurden abzentrifugiert (3 Min. , 2000 g), das Sediment 2 mal mit 10 ml eiskalter 0,25 N HClO₄ behandelt (Entfernung der säurelöslichen Nucleotide) und danach 2 mal mit je 2 ml 0,5 N HClO₄ bei 80 C hydrolysiert. Nach Abzentrifugieren (5 Min. , 2000 g) wurde der Überstand für RNA- und DNA-Bestimmungen verwendet.

2.1.4. Bestimmung der Zellzahl, Anteil toter Zellen

Die genaue Zellzahl einer Suspension wurde mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Der Anteil toter Zellen einer Suspension wurde durch Trypanblaufärbung kenntlich gemacht. Trypanblau dringt als Farbstoff nur in die Zelle ein, wenn die Plasmamembran geschädigt ist; im Fall einer Blaufärbung wird die Zelle als tot angesehen; ungefärbte Zellen gelten als lebend.

Bei der Anfärbung wurden 0,8 ml Zellsuspension mit 0,2 ml 0,4 %iger Trypanblau-Lösung versetzt. Die mikroskopische Auszählung erfolgte 5 Min. nach Zugabe von Trypanblau.

2.2. Protein-, DNA-, RNA-Bestimmung, Laktat-Bildung

2.2.1. Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von LOWRY und MITARBEITERN(1951) bestimmt.

Lösungen:

Lowry A:	100g Na_2CO_3 2,0g NaOH 0,134 $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ pro 100ml Aqua bidest
Lowry B:	0,5g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ / 100ml
Lowry C:	1ml Lowry B zu 50ml Lowry A
Phenol-Reagens:	5ml Folin-Ciocalteus Phenol R. (Merck, Darmstadt), zu 6ml Aqua bidest
(Folins-Reagens)	
Albumin-Stammlösung:	50mg Rinderalbumin in 50ml Lowry A gelöst

<u>Testansatz:</u>	0,5ml Probe 4,5ml Lowry C 0,5ml Folins-Reagens
--------------------	--

Die Messung erfolgte bei einer Extinktion von 660nm 30 Minuten nach der Zugabe von Folins-Reagens. Für die Auswertung wurde eine Eichkurve angefertigt. Nicht denaturierte Zellbestandteile wurden in Lowry C gelöst, durch PCA oder TCA gefälltes Protein wurde durch 1 N NaOH in Lösung gebracht.

2.2.2. DNA-Bestimmung

Die DNA-Bestimmung wurde nach BURTON (1955) mit Diphenylamin-Reagens durchgeführt. Eine DNA-enhaltende Probe wurde 2mal 20 Minuten lang mit 4ml 0,5N HClO_4 bei 70 C hydrolysiert (s. S.19).

Testansatz: 2,0 ml Hydrolysat
0,1 ml 0,35 M Acetaldehyd
4,0 ml Diphenylamin-Reagenz (7,5 g Diphenylamin in
500 ml Eisessig und 7,5 ml konz. H_2SO_4)

Die Messung erfolgte bei einer Extinktion von 600 nm, nachdem die verschlossenen Probengefäße 16 bis 25 Std. bei 30 C inkubiert waren.

Als Standard diente 10^{-4} M Desoxyadenosin-Lösung.

2.2.3. RNA-Bestimmung

RNA wurde mit Orcinol-Reagenz nach CERIOTTI (1955) bestimmt. Zellfragmente wurden 2 mal mit 0,5 N HClO_4 20 Min. bei 80 C hydrolysiert.

Testansatz: 0,5 ml Hydrolysat
0,5 ml 0,5 N HClO_4
1,0 ml Orcinol-Reagenz (200 mg Orcin in 90 ml konz.
 HCl lösen, dazu 10 ml 0,004 M CuCl_2 -Lösung)

Nach Inkubation von 40 Min. in kochendem Wasser wurde die Extinktion bei 675 nm gemessen.

Als Standard diente eine 5×10^{-5} M Adenosin-Lösung.

Da Desoxyribose bei der Ribose-Bestimmung interferiert (eine äquimolare Desoxyribose-Lösung ergibt ca. 10 % der Extinktion einer Ribose-Lösung), wurden jeweils entsprechende Korrekturen bei jeder Bestimmung durchgeführt.

2.2.4. Laktat-Bestimmung

Die Bestimmung von L-Laktat erfolgte mit der Boehringer-Testkombination "Laktat" nach HOHORST (1970).

Reagenzien: Perchlorsäure (PCA), 0,6N
 Glycin/Hydrazinpuffer, 0,5/0,4M, pH 9,0
 NAD-Lösung, 0,027M
 Laktat-Dehydrogenase (LDH), Kristallsuspension 5mg/ml

Enteiweißung: 0,5ml Probe
 1,5ml 0,6N PCA

Nach 10 Minuten wurde das gefällte Protein bei Raumtemperatur abzentrifugiert (5 Min. 3000g), der Überstand wurde für den Test verwendet.

Testansatz: 2,0ml Puffer
 0,10ml Überstand nach Enteiweißung
 0,01ml LDH-Suspension
 0,20ml NAD-Lösung

Nach Inkubation von 1 Stunde bei 25 °C wurde die Extinktion bei 366nm gemessen. Mit einem Laktat-Standard wurde die Laktatproduktion bestimmt.

2.3. Enzymbestimmung

Die Bestimmung der Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels erfolgte im optischen Test nach WARBURG und CHRISTIAN (1936) nach den Angaben aus "Methoden der enzymatischen Analyse" von BERGMEYER (1970)

Als Puffer wurden verwendet:

Phosphatpuffer: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,2M
 EDTA 10mM
 pH = 7,0

TRAP 1: Triäthanolamin (TRA), 100mM
 pH = 7,6

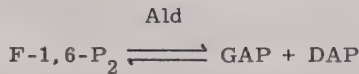
TRAP 2: TRA, 20mM
 EDTA, 4mM
 pH = 7,4

TRAP 3: TRA, 100mM
EDTA, 10mM
pH = 7,6

TRAP 4: TRA, 100mM
EDTA, 10mM
MgSO₄, 16mM
pH = 7,6

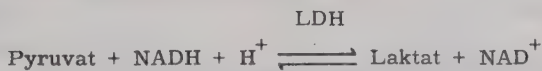
Testansätze:

Aldolase (Ald), EC 4.1.2.13.



TRAP 3		0,500ml
NADH	c= 15mg/ml	0,020ml
FDP (Fructose-1,6-Diphosphat)	100mM	0,040ml
TIM (Triose-Phosphat-Isomerase)		0,005ml
GDH (Glycerin-1-Phosphat-Dehydrogenase)		0,005ml
Aqua bidest	ad 1,00ml	0,330ml
Zellextrakt		0,100ml

Laktat-Dehydrogenase (LDH), EC 1.1.1.27



TRAP 3		0,500ml
NADH	c= 15 mg/ml	0,020ml
Zellextrakt		0,010ml
Aqua bidest		0,045ml
Pyruvat	120mM	0,020ml

Hexokinase (HK), EC 2.7.1.1.



TRAP 4		0,500 ml
NADP	c = 15 mg/ml	0,020 ml
ATP	100 µM	0,0150 ml
Glucose	50 mM	0,020 ml
G-6-P-DH (Glucose-6-P-Dehydrogenase),	c=5 mg/ml	0,005 ml
Aqua bidest	ad 1 ml	0,340 ml
Zellextrakt		0,100 ml

Fruktose-6-P-Kinase (F-6-P-K), EC 2.7.1.11.



TRAP 4		0,500 ml
NADH	c = 15 mg/ml	0,020 ml
ATP	100 mM	0,010 ml
F-6-P	80 mM	0,020 ml
Aldolase		0,005 ml
TIM		0,005 ml
GDH (Glycerin-1-P-Dehydrogenase)		0,005 ml
Aqua bidest		0,415 ml
Zellextrakt		0,020 ml

Hexosephosphat-Isomerase (HIM), EC 5.3.1.9.



TRAP 3		0,500 ml
NADP	c = 15 mg/ml	0,020 ml
F-6-P	80 mM	0,020 ml
G-6-P-DH		0,005 ml
Aqua bidest		0,435 ml
Zellextrakt		0,020 ml

Glycerin-3-P-Dehydrogenase (GDH), EC 1.1.1.8.

GDH



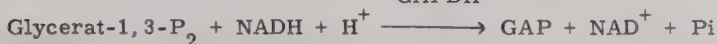
TRAP 3		0,500ml
NADH	c= 15 mg/ml	0,020ml
Zellextrakt		0,100ml
Aqua bidest		0,370ml
DAP (Dihydroxyacetonphosphat), 40mM		0,010ml

Glycerinaldehyd-P-Dehydrogenase (GAPDH), EC 1.2.1.12

PGK



GAPDH



TRAP 4		0,500ml
NADH	c= 15 mg/ml	0,020ml
ATP	100mM	0,010ml
3-PGS (3-Phosphoglycerinsäure), 350mM		0,010ml
PGK (Phosphoglycerat-Kinase), c= 10 mg/ml		0,005ml
Aqua bidest		0,405ml
Zellextrakt		0,020ml
Glutathion (reduziert), 120mM		0,020ml

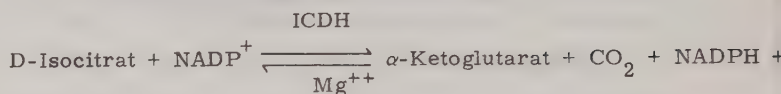
Pyruvat-Kinase (PK), EC 2.7.1.40

PK



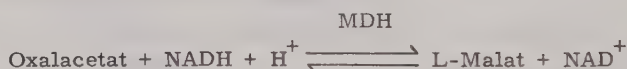
TRAP 4		0,500ml
NADH	c= 15 mg/ml	0,020ml
ADP	100mM	0,010ml
PEP	40mM	0,020ml
LDH	c= 5 mg/ml	0,005ml
Aqua bidest		0,435ml
Zellextrakt		0,010ml

Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH), EC 1.11.42.



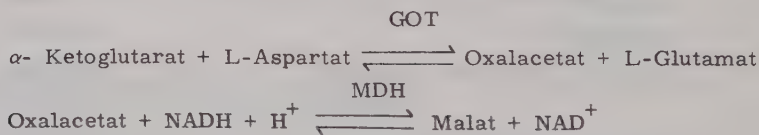
TRAP 4		0,500ml
NADP	c= 15 mg/ml	0,020ml
Zellextrakt		0,100ml
Aqua bidest		0,370ml
D-Isocitrat	160mM	0,010ml

Malat-Dehydrogenase(MDH), EC 1.1.1.37.



TRAP 3		0,500ml
NADH	c= 15 mg/ml	0,020ml
Zellextrakt		0,010ml
Aqua bidest		0,450ml
OAA	10mM	0,020ml

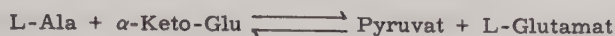
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), EC 2.6.1.1.



Phosphat-Puffer		0,500ml
NADH	c= 15 mg/ml	0,020ml
α -Keto-Glu	200mM	0,020ml
MDH		0,005ml
Zellextrakt		0,010ml
Aqua bidest		0,405ml
L-Asp	1M	0,040ml

Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), EC 2.6.1.2.

GPT



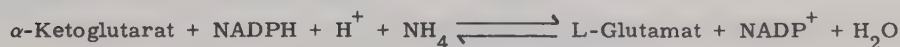
LDH



Phosphat-Puffer		0,500ml
NADH	c= 15 mg/ml	0,020ml
α -Keto-Glu	200mM	0,040ml
LDH		0,005ml
Zelleextrakt		0,100ml
Aqua bidest		0,285ml
α -L-Ala	1,6M	0,050ml

Glutamat-Dehydrogenase (GluDH), EC 1.4.1.3.

GluDH



TRAP 3		0,500ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2M	0,020ml
NADH	c= 15 mg/ml	0,020ml
Zelleextrakt		0,100ml
Aqua bidest		0,340ml
α -Keto-Glu	200mM	0,020ml

Glucose-6-P-Dehydrogenase (G-6-PDH), EC 1.1.1.49.

G-6-PDH



TRAP 3		0,500ml
NADP	c= 15 mg/ml	0,020ml
Zelleextrakt		0,100ml
Aqua bidest		0,360ml
G-6-P	c= 50 mg/ml	0,020ml

6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGDH), EC 1.1.1.44.

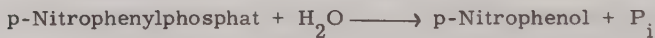
6-PGDH



TRAP 4		0,500ml
NADP	c= 15 mg/ml	0,020ml
Zellextrakt		0,100ml
Aqua bidest		0,180ml
Gluconat-6-P	c= 15 mg/ml	0,200ml

Saure Phosphatase (s. Pase), EC 3.1.3.2.

SP



Reagenzien: 50mM Citratpuffer, pH 4,8
 5,5mM p-Nitrophenylphosphat

Testansatz: 1,0ml Puffer/Substrat
 0,1ml Zellextrakt
 Inkubationszeit 30Minuten dann 2,0ml 0,1N NaOH
 dazugeben

Das bei der Reaktion entstandene, gelbgefärbte p-Nitrophenyl wurde bei einer Extinktion von 405 nm gemessen.

Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die enzymatische Aktivität der $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -ATPase wurde durch Messung des freigesetzten anorganischen Phosphats (P_i) nach einer modifizierten Methode (SCHACHTSCHABEL, 1972) nach BONTING (1961) ermittelt.

<u>Meßmedium:</u>	<u>Endkonzentration</u>
MgCl ₂	10 mM
KCl	10 mM
NaCl	30 mM
EDTA	1 mM
Tris pH 7,4	100 mM
ATP	10 mM
Quabain	0,1 mM
Aqua bidest	ad 2,00 ml
Zellextrakt, 10 x 10 ⁶ Zellen/ml	0,1 bis 0,2 ml

Die Reaktion wurde nach 0, 15, 30 Min. gestoppt durch Pipettieren von 0,1 ml Probe in Eppendorf-Gefäße mit 0,5 ml vorgelegter 10 % TCA (0 C). Nach Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurden 0,5 ml des TCA-Überstands mit 0,5 ml Farbreagens versetzt. Als Reagens für den Nachweis des nach ATP-Spaltung freiwerdenden Phosphats diente folgende Lösung:

400 mg FeSO₄ in 10 ml 1% Ammoniummolyb-
datlösung in 1,15 N H₂SO₄.

Das Maximum der Blaufärbung trat nach einer Inkubation im Eisbad nach 30 Minuten auf. Die Extinktion wurde bei 740nm gemessen. Als Standard diente eine 25µM KH₂PO₄-Lösung.

Alle Aktivitätsbestimmungen der NAD/NADH₂ - bzw. NADP/NADPH₂ - abhängigen Enzyme wurde bei 25 C durchgeführt; die Extinktion wurde bei 340nm gemessen; Extinktionsänderungen wurden mit einem Kompensationsschreiber Servogor RE 511 registriert. Es wurden die Spektralphotometer von Zeiss: PMQ II und PM 4, mit Küvettenauto-
matik verwendet.

Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten für $\text{NADH}_2/\text{NADPH}_2$ ($\epsilon_{340} = 6,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die Enzymaktivitäten wurden auf den Proteingehalt der Proben bezogen.

2.4. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs

Der zelluläre Sauerstoffverbrauch wurde mit Hilfe einer teflonbespannten Platinelektrode gemessen (CLARK, 1953; KLINGENBERG, 1964). Vor jeder Messung wurde die Meßlösung mit einem Gasgemisch von 7% CO_2 , 20% O_2 und 73% N_2 gesättigt. Die Meßtemperatur betrug 37 C.

Die teflonbespannte Platinelektrode (Durchmesser 50 μm) ragte in ein temperiertes Reaktionsgefäß mit 1,5ml Inhalt. Die Abnahme des Sauerstoffgehaltes wurde durch ein Amperemeter registriert, dem ein Kompensationschreiber (Linoscript LS 100, Fa. Linseis) angeschlossen war. Das verwendete Nanoamperemeter, sowie die Platinelektrode waren in der Feinmechaniker-Werkstatt des Physiologisch-chemischen Instituts, Marburg, gefertigt.

Nach MARKHAM und KOBE (1941) beträgt die O_2 -Löslichkeit in Wasser 0,0239 ml O_2 / ml H_2O bei 37 C, 760 Torr. Nach Begasung mit dem angegebenen Gasgemisch enthielt das Meßmedium 20 % des O_2 -Sättigungswertes, also 4,78 $\mu\text{l O}_2$ /ml.

Vor Beginn wurde der Schreiber auf die maximale Sauerstoffsättigung geeicht. Der Sauerstoffverbrauch wurde über ca. 15 Minuten registriert und zur Ausrechnung der verbrauchten O_2 -Menge auf den Sättigungswert bezogen.

Die Zellkonzentration pro Meßansatz betrug $0,4-4,0 \times 10^6$ Zellen /ml Meßlösung.

Salzlösungen

Im Zusammenhang mit der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs wurden folgende Salzlösungen verwendet: Ringer A-, Locke-, Tyrode- (aus ROMEIS, Mikroskopische Technik, 1948) und Ringer B-(CRABTREE, 1929) Earles-(EARLE, 1943) Lösung. Die Salzkompenten der Lösung sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 2: Zusammensetzung verschiedener physiologischer Salzlösungen. Angaben: g/1000 ml.

Lösung	NaCl	KCL	CaCl ₂	NaHCO ₃	NaH ₂ PO ₄	MgCl ₂	MgSO ₄
Ringer A	8,5	0,25	0,3	0,2	-	-	-
Ringer B	7,1	0,19	0,2	2,1	-	-	-
Locke	8,5	0,42	0,24	0,2	-	-	-
Tyrode	8,0	0,2	0,2	1,0	0,05	0,1	-
Earle	6,8	0,4	0,2	2,2	0,125	-	0,2

2.5. Bestimmung der Glycosaminoglycane (GAG)

Die Biosynthese von Glycosaminoglycanen wurde bestimmt durch den Einbau von ³⁵SO₄⁻⁻ und ¹⁴C-Glucosamin.

Lösungen:

Earles Salz

Pronase 1mg/ml

TCA 40%

Na₂SO₄ x 10 H₂O 200g/3,0 l H₂O dest.

Tris-Puffer, pH 7,5 0,05M

Thimerosal 0,1mg/ml

Toluol wenige Tropfen

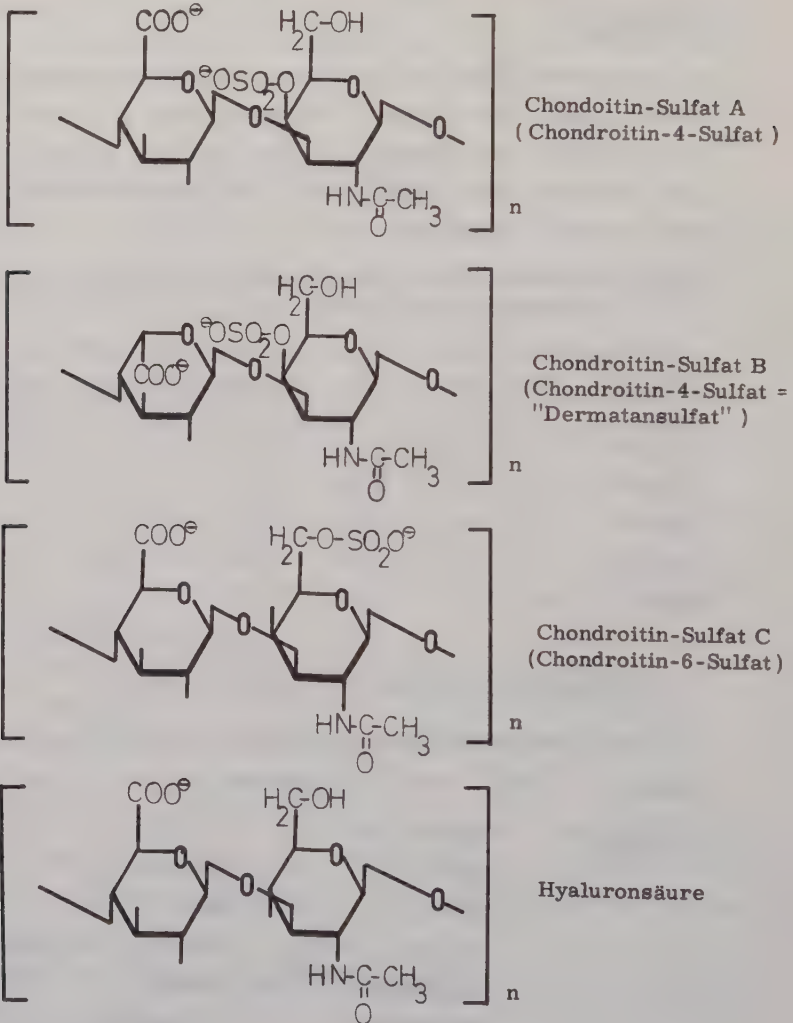
Ca-Acetat, pH 7,2 0,3M

Chondroitin-

Sulfat A, B, C 1mg/ml H₂O bidest

Alcianblau 0,5% in 3% Essigsäure

Abb. 2: Disaccharideinheiten saurer Glycosaminoglycane



$n = 100 - 1000$

Aufarbeitung :

Zur radioaktiven Markierung der Glycosaminoglycane wurden ^{14}C -Glucosamin (0,3 $\mu\text{Ci/ml}$) und $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (2 $\mu\text{Ci/ml}$) in das Kulturmedium gegeben. Die Inkubationszeit betrug 16 Std. .

Das Medium der Zellkulturen wurde dekantiert, danach wurden die Zellen 3 mal mit Earles Salz (25C) gewaschen, in 10 ml 0,05 M Tris-HCl von der Glaswand mit einem Gummiwischer abgekratzt und mit einem Sonikiergerät (Branson-Sonifier, Typ LS 75) 20 Sek. auf Stufe 3 sonikiert.

Die Aufarbeitung des Kulturmediums erfolgte parallel zur Aufarbeitung der Zellen.

Pronase-Verdauung (EDSTRÖM, 1969)

10 ml Medium bzw. 10 ml Zellhomogenat wurden mit 200 μl Pronase (1mg/ml) versetzt; zur Verhinderung von bakterieller Kontamination wurden 20 μl Thimerosal (0,1 mg/ml) zugesetzt. Die Pronase-Verdauung erfolgte 18 Std bei 37 C; sie wurde gestoppt durch Zugabe von 40% TCA (Endkonzentration 10% TCA). Das gefällte Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand in Dialyseschläuche gefüllt. Durch die Dialyse sollte nicht eingebautes $^{35}\text{SO}_4$ und ^{14}C -Glucosamin ausgewaschen werden.

Dialyse

Die Dialyse erfolgte, bei Markierung der GAG mit $^{35}\text{SO}_4$ 2mal 12 Std. gegen 0,2 M Na_2SO_4 , bei Markierung mit ^{14}C -Glucosamin 2mal gegen Aqua dest. mit Zusatz von 150 μg /Liter Glucosamin; anschließend wurde 3mal 12 Std. gegen Aqua dest dialysiert. Dem Dialysemedium wurde ebenfalls Thimerosal zugegeben (500 $\mu\text{g}/3\text{ l}$), die Oberfläche wurde mit einigen Tropfen Toluol abgedeckt.

Die dialysierten Proben wurden in 100- bzw. 200 ml-Kolben gefüllt und in diesen Gefäßen lyophilisiert (Gerät: Lauda-Ultrakryomat K 60 SDW).

Elektrophorese

Das Lyophilisat wurde in 0,5 ml Aqua bidest. aufgenommen und der Kolben noch einmal mit 0,2 ml nachgewaschen. Die Proben (0,7 ml) enthielten die zu bestimmenden GAG.

2 µl der Probe wurde mit einem Auftragsstempel der Fa. Boskamp auf Cellulose-Acetat-Folien aufgetragen, die vorher mit 0,3 M Ca-Acetat-Lösung getränkt waren. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,3 M Ca-Acetat-Lösung verwendet.

Die Elektrophorese wurde 2 Std. bei einer konstanten Stromstärke von 0,5 A/cm durchgeführt.

Zur genauen Identifizierung der GAG wurde jeder Probe ein Standardgemisch aus Chondroitin-Sulfat -A, -B, -C und Hyaluronsäure zugesetzt. Die Cellulose -Acetat-Folien wurden nach Beendigung der Elektrophorese zur Anfärbung der GAG-Banden in 0,5%ige Alcianblau-Lösung in 3% Essigsäure 20 Min. gelegt. Nach der Färbung wurde überschüssige Alcianblau-Lösung in 0,05 M $MgCl_2$, 0,025 M Na-Acetat-Lösung, pH 5,8 in Äthanol ausgewaschen. Die Cellulose-Acetat-Folie wurde auf einer Glasplatte getrocknet, die GAG-Banden wurde ausgeschnitten und in einer Szintillationslösung (BRAY, 1960) in Szintillationsgefäßen gelöst. Die Einbauraten wurden mit einem Packard-Szintillationszähler (Modell 574) bestimmt.^x

Die Elektrophorese-Kammer und Netzgerät für die Elektrophorese waren in der Feinmechaniker - und Elektronik -Werkstatt des Physiologisch,-chemischen Instituts der Universität Marburg gefertigt.

^x Nach der Markierung mit $^{35}SO_4^{--}$ konnten die GAG nicht einwandfrei identifiziert werden, da eine genaue Auftrennung von sulfatierten GAG und nicht sulfatierter Hyaluronsäure nicht möglich war; aus diesem Grund wurden die Ergebnisse, die durch $^{35}SO_4^{--}$ -Einbau erhalten wurden, nicht berücksichtigt.

2.6. Membranisolierung, Reinheitskriterien von Plasmamembranen

Die Isolierung von Plasmamembranen wurde nach drei Methoden durchgeführt:

1. WARREN, GLICK, NASS (1966),
2. FORTE, FORTE, HEINZ (1973),
3. BOONE und MITARBEITER (1969).

Die Methoden 1 und 2 führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nur die Methode 3 von BOONE und MITARB. benutzt.

Die Versuchsdurchführung der Methoden 1 und 2 wurde nur kurz beschrieben; für das Studium von Einzelheiten sei auf die Originalliteratur verwiesen.

Zur Überprüfung der Reinheit wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt; als enzymatische Reinheitskriterien wurden die Aktivitäten der 5'-Nucleotidase, der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase und der Succinat-Dehydrogenase bestimmt.

2.6.1. Membranisolierung

2.6.1.1. Isolierung nach WARREN, GLICK, NASS (1966)

WARREN und MITARB. isolierten Plasmamembranen aus Mäuse-L-Zellen mit der Zink-Ionen-Methode:

Die Zellen wurden bei Zimmertemperatur in 0,15 M NaCl-Lösung gewaschen, und in 0,15 M NaCl-Lösung suspendiert. Zu 1 ml dieser Zellsuspension (5×10^7 Zellen) wurden 9 ml 0,001 M ZnCl_2 -Lösung gegeben; nach einer Inkubation von 5 Min. wurden 0,5 ml 1 % Tween-20 und nach weiteren 2 Min. 0,5 ml 0,01 M ZnCl_2 -Lösung zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Potter-Elvehjamm-

Homogenisator bei 60 Auf- und Abwärtsbewegungen (5 Min. , 3 C) homogenisiert. Aus dem Homogenat wurden durch partielle Zentrifugation Zellkerne und Nicht-Membranbestandteile weitgehend entfernt. Die Plasmamembranfraktion wurde in 35 % Saccharose suspendiert und auf einem linearen Saccharose-Gradienten 40 - 65 % (w/v) durch Zentrifugation im Spinco-Rotor SW 25.2, 1 Std. , 25 000 g, 3 C gereinigt. Eine "Membranbande" bildete sich bei 55 % (d = 1,258) Saccharose.

2.6.1.2. Isolierung nach FORTE, FORTE und HEINZ (1973)

Nach dem Waschen der Zellen in 0,15 M NaCl-Lösung wurden die Zellen in einem Medium (pH 7,4) von

18 mM Tris-HCl

25 mM NaCl

0,5 mM CaCl_2

bei 3 C mit einem Dounce-Homogenisator durch 30 - 40 Auf- und Abwärtsbewegungen homogenisiert. Das Homogenat wurde differenziell zentrifugiert, nach Abtrennung der ganzen Zellen und der Zellkerne, der Mitochondrien und Mikrosomen wurde die Plasmamembranfraktion auf einen Saccharose-Gradienten mit folgenden Banden aufgetragen: 60, 50, 45, 40 % (w/v). Mit einem Spinco-Rotor SW 25.2 wurde 60 Min. bei 3 C und 90 000 g zentrifugiert. Die Membranfraktion bildete sich bei 40 - 45 % (d = 1,19) Saccharose.

2.6.1.3. Isolierung nach BOONE und MITARB. (1969)

Die Isolierung von Plasmamembranen durch BOONE und MITARB. wurde an HeLa-Zellen durchgeführt. Mit einigen Modifikationen ist die Methode auf Ehrlich-Ascites-Zellen anwendbar. Als Verbesse-

rung der Methode von FORTE und HEINZ enthält die Methode von BOONE und MITARB. einen zusätzlichen Reinigungsschritt: Nach der Isolierung der Membranen auf diskontinuierlichem Gradienten, zentrifugierten sie die Membranfraktion nach Ultraschallbehandlung ein weiteres Mal auf linearem Gradienten.

Lösungen:

Stammlösungen [Tris-Mg- (TM-) Stammlösungen]:

A. 1 M Tris, 0,1 M $MgCl_2$, pH 7,4,

B. 1 M Tris, 0,1 M $MgCl_2$, pH 8,6.

Durch Verdünnung der Stammlösungen wurden bereitet:

1a) TM, pH 7,4: Verdünnung der Stammlösung A,

1b) TM, pH 8,6: Verdünnung der Stammlösung B,

mit Aqua bidest. (1 : 100),

Endkonz.: 0,01 M Tris-HCl, 0,001 M $MgCl_2$.

2a) TM-NaCl-Lösung, pH 7,4: Verdünnung der Stammlösung A,

2b) TM-NaCl-Lösung, pH 8,6: Verdünnung der Stammlösung B,

mit 0,85 %iger NaCl-Lösung (1 : 100).

3a) TM-Saccharose, pH7,4: Verdünnung der Stammlösung A,

3b) TM-Saccharose, pH8,6: Verdünnung der Stammlösung B,

mit 0,25 %iger Saccharose-

Lösung (1 : 100).

Saccharose-Gradienten (Bereitung in 5 ml Polyallomer-Becher,

Fa. Beckman)

I diskontinuierlich: 45, 40, 35, 30 % (w/w) in TM, pH 8,6 jeweils

0,9 ml der Saccharose-Lösungen wurden übereinander geschichtet.

II linear: Mit einem Gradientenmischer (LKB Ultrograd 11 300) wurde ein linearer Gradient von 42 bis 30 % Saccharose gegossen. Der lineare Gradient kann durch Schichtung eines flachen diskontinuierlichen Gradienten (42, 39, 36, 33, 30 % (w/w)) ersetzt werden.

Versuchsdurchführung:

200×10^6 Zellen wurden 3 mal in 5 ml TM-NaCl-Lösung, pH 7,4, eiskalt, gewaschen; zwischendurch wurde abzentrifugiert (1500 g, 5 Min.). Die Zellen wurden im Dounce-Homogenisator, Typ S bei 0 C in 5 ml TM, pH 7,4 zunächst 5 Min. inkubiert.

Die Homogenisation erfolgte im Dounce-Homogenisator durch 20 Auf- und Abwärtsbewegungen des Pistills; die Vollständigkeit der Zellzerstörung wurde im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Sofort nach der Homogenisation wurde dem Homogenat Saccharose-Lösung zugegeben (zu 5 ml Homogenat- 2,5 ml 30 % Saccharose-Lösung; Endkonzentration 0,25 M). Es folgte eine partielle Reinigung der Membranfraktion.

1. Zentrifugation

Zentrifuge: Sorvall B 2

Das Homogenat wurde 2 mal 15 Min. , 4 C, 1500 g;
 1 mal 15 Min. , 4 C, 4000 g zentrifugiert.

Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde das Sediment jeweils mit 5 ml TM-Saccharose, pH 8,6 im Dounce-Homogenisator resuspendiert. Zuletzt wurden die Sedimente vereint und in 1,5 ml TM-Saccharose, pH 8,6 durch "sanftes" Beschallen (St. 1, 10 Sek.) mit einem Branson-Sonifier resuspendiert.

Das Homogenat wurde auf den diskontinuierlichen Gradienten I (s. o.) aufgetragen und erneut zentrifugiert.

2. Zentrifugation

Zentrifuge: Spinco-Ultrazentrifuge L 2, Rotor SW 50-L

Zentrifugation: 60 Min. , 70 000 g, 3 C

Es bildeten sich folgende Fraktionen:

I über 30 %	Mikrosomen
II 30 - 35 %	Membranen, Membranghosts
III 35 - 40 %	Mitochondrien, Membranghosts
IV 40 - 45 %	Zellfragmente
V Sediment	Zellen und Zellkerne

Den Fraktionen II und III (ca. 1 ml) wurden 0,5 ml TM, pH 8,6 zugegeben; danach wurde im Branson-Sonifier sonikiert (St. 7, 5 Sek.). Die sonikierte Probe wurde auf den linearen Gradienten II (s. o.) (30 - 42 %) aufgetragen und noch einmal zentrifugiert.

3. Zentrifugation

Zentrifuge: Spinco-Ultrazentrifuge L 2, Rotor SW 50-L

Zentrifugation: 16 Std., 24 000 g, 3 C

Es bildeten sich folgende Fraktionen:

1. 30 - 33 %	Membranvesikel
2. 33 - 36 %	Membranen und Mitochondrienvesikel
3. 36 - 38 %	Mitochondrien
4. 38 - 42 %	Mitochondrien und Zellreste

2.6.2. Reinheitskriterien von Plasmamembranen

2.6.2.1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

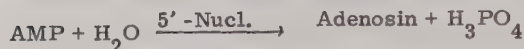
Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Proben im jeweiligen Homogenisationsmedium einmal gewaschen. Zur Ausbildung eines Sediments wurden die Proben 30 Min. bei 107 000 g, 3 C im Spinco-Rotor SW 50-L zentrifugiert.

Das Sediment wurde mit OsO_4 fixiert und 15 Min mit Bleiacetat kontrastiert.

Schnitte und Aufnahmen wurden von Frau Dr. R. Marx, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Marburg angefertigt.

2.6.2.2. Bestimmung von Marker-Enzymen

Bestimmung der 5'-Nucleotidase (GERLACH und HIBY, 1970)



Lösungen:

Mangan-II-sulfat	20	mM
Veronal-Puffer, pH 7,4	40	mM
Nickelchlorid	0,1	mM
Adenosin-5'-monophosphat (AMP)	10	mM
Trichloressigsäure	0,68	M
Ammoniumheptamolybdat in 6 N H_2SO_4	40	mM
Reduktionslösung: Kaliumdisulfit		
4-(Methylamino)-phenolsulfat		
Natriumacetat (2,5 M)		

Testansatz:

	I	II	III	Standard
Veronal-Puffer	1,5 ml	1,3 ml	1,5 ml	1,5 ml
Mangan-II-sulfat	0,1 "	0,1 "	0,1 "	0,1 "
Nickelchlorid	- "	0,2 "	- "	- "
Zellextrakt	0,2 "	0,2 "	0,2 "	- "
Aq. bidest.	- "	- "	0,2 "	0,3 "
AMP	0,2 "	0,2 "	- "	- "
P _i , 12,5 mM	- "	- "	- "	0,1 "

NiCl₂ hemmt die Nucleotidase selektiv.

Nach einer Inkubation von 30 Min. bei 37 C wurde die Reaktion mit TCA (Endkonzentration 0,34 M) gestoppt; nach einer Zentrifugation der Proben wurde der Überstand mit Molybdat- und Reduktionslösung versetzt; die entstehende Blaufärbung wurde durch Natriumacetat verstärkt.

Die colorimetrische Messung erfolgte in 2-cm-Küvetten bei 578 nm.

Auswertung: $E_I - E_{II} = \Delta E$

ΔE -Bestimmung durch Standard,

linearer Extinktionsanstieg bis 0,04 mg P_i/ml.

Bestimmung der Succinat-Dehydrogenase (GREEN, MII, KOHOUT,
1955, mod.)

Succinat-DH ist ein membrangebundenes Enzym der Mitochondrien, die gemessene Aktivität dieses Enzyms ist ein Maß für die Verunreinigung der Plasmamembranen durch Mitochondrienmembranen.

Lösungen:

Phosphat-Puffer, pH 7,6	200	mM
EDTA	2	mM
Cytochrom C ³⁺	4	%
Succinat	0,5	M
KCN	0,1	M

Testansatz:

Phosphat-Puffer	100	mM	0,5	ml
EDTA	0,5	mM		
Cyt-C ³⁺	0,2	%	0,05	ml
KCN	0,01	M	0,02	ml
Succinat	25	mM	0,1	ml
Aq. bidest.	ad 1,0	ml	0,33	ml

Die Extinktionszunahme wird bei 550 nm mit einem Kompensations-schreiber registriert. Die Auswertung erfolgt unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten für Cyt-C²⁺ = $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

ATPase-Bestimmung siehe Seite 28

2.7. Lipidanalysen

Es wurden Lipidanalysen an ED-0,15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen durchgeführt, sowohl an intakten Zellen, als auch an isolierten Plasmamembranen von ED-0,15-, EG-65-, ED-in vivo- und ED-0,35-Zellen.

Sämtliche Lipidanalysen wurden im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Bonn von Herrn Prof. H. Egge oder unter seiner Anleitung durchgeführt.

Mikrolipidanalysen wurden nach EGGE und MITARB. (1970) durchgeführt.

2.7.1. Aufarbeitung der Kulturen

ED-0,15-Zellen und EG-65-Zellen wurden im Kulturgefäß nach dem Dekantieren des Mediums 3 mal mit 15 ml Earles Salz-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden mit 3 ml eines Gemisches aus Äther/Äthanol (1:1) überschichtet. Auf einem Wasserbad wurden die Proben bei 100 C eingedampft; dieser Vorgang wurde 2 mal wiederholt.

ED-in vivo-Zellen wurden 3 mal in Earles Salz-Lösung gewaschen, zwischen den Waschungen wurden die Zellen abzentrifugiert. Die Zellen wurden 3 mal mit Äther/Äthanol in einem 50 ml-Zentrifugengefäß eingedampft.

Die Lipide der Membranproben von ED-0,15-, EG-65-, ED-in vivo- und ED-0,35-Zellen wurden extrahiert, nachdem das Membransediment durch Resuspendieren mit Äther/Äthanol (1:1) in einem Eppendorf-Gefäß 3 mal eingedampft war.

Extraktion der Lipide (FOLCH und MITARB., 1957)

Durch Aufschütteln mit 1,5 ml Chloroform/Methanol (8:5) (v/v) wurden die Lipide aus den Proben extrahiert. Das Lipidgemisch wurde mit einer Pasteur-Pipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und unter Stickstoff im Wasserbad bei 50 - 55 C zur Trockne gebracht. Das Lipidgemisch wurde 2 mal mit 0,5 ml Chloroform/Methanol (8:5) (v/v) aufgenommen, zusammen mit 200 µl Aqua bidest. 1 Min. geschüttelt und anschließend zentrifugiert (30 Sek., 16 000 g).

Die obere Phase wurde vorsichtig abgehoben und verworfen; die Chloroformphase wurde unter Stickstoff im Wasserbad bei 50 - 55 °C bis zur Trockne eingedampft.

2. 7. 2. Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Lipide

Die eingedampften Lipidproben wurden in 100 µl Chloroform/Methanol (2:1) durch Aufschütteln gelöst. 50 µl der Lösung wurden auf einen vorher austarierten Aluminiumbecher gegeben und auf einem Heizblock bei 140 °C 2 Min. getrocknet. Die getrocknete Lipidprobe wurde auf einer Cahn-Gram-Elektrowaage ausgewogen. Aus den Lipidextrahierten Proben wurde eine Proteinbestimmung nach LOWRY (1951) durchgeführt. Die gewogene Lipidmenge wurde auf µg Lipid/mg Protein umgerechnet.

Von dem verbleibenden Rest der Probe wurde dünnschichtchromatographisch das Lipidspektrum nach EGGE und MITARB. (1970) und SCHUNCK (1973) ermittelt:

Die Chromatographie wurde auf Objektträgern durchgeführt, die mit Kieselgel Camag D-0 beschichtet waren. Mit Hilfe einer feinen Glaskapillare wurde etwa 8 mm vom unteren Rand der Lipidextrakt bandenförmig auf die Kieselgelschicht aufgetragen. Als Chromatographiegefäße dienten Wägegläschen mit Schliffdeckel (NS 55), in die etwa 3 mm hoch die einzelnen Laufmittel eingefüllt wurden. Um eine Trennung der Phospholipide, Cerebroside und Cholesterin zu erhalten, wurden Laufmittelsysteme sinkender Polarität verwendet (EGGE und MITARB. , 1970).

Laufmittel: 1) CHCl_3 / CH_3OH / Eisessig (65 : 28 : 9; v/v/v),

Laufstrecke: 15 mm

2) CHCl_3 / CH_3OH / H_2O (75 : 25 : 4; v/v/v),

Laufstrecke: 45 mm

3) CHCl_3

Laufstrecke: 70 mm

Die Chromatogramme wurden hintereinander in diesen drei Laufmitteln aufgetrennt, vor jedem Wechsel des Laufmittels wurden die Chromatogramme an der Luft getrocknet.

Die Objektträger wurden nach der Lipidauftrennung mit 10 %iger Schwefelsäure besprüht und 2 Min. auf einem Heizblock (100 C) getrocknet. Anschließend wurden die Lipide bei 200 C auf einem Heizblock durch 5 minütiges Erhitzen verkohlt.

Die Lipidverteilung wurde in einem Densitometer (Joyce Loebel Chromoscan) quantitativ und qualitativ bestimmt. Für die quantitative Auswertung wurden Schwärzungsfaktoren von SCHUNCK (1973) verwendet.

Gaschromatographie

Die Lipidproben wurden bei 50 - 55 C zur Trockne eingedampft und mit 0,2 ml 0,5 N KOH in Methanol verseift. Nach einer Inkubationszeit von 1 Std. wurden die "Seifen" durch Zugabe von 0,1 ml 2 N HCl in Fettsäuremethylester überführt. Durch Extraktion mit n-Hexan (3 x 1 ml) wurden die Ester und noch vorhandene freie Fettsäuren in Kugelrohre (Willstätter) überführt; durch Diazomethan wurden freie Fettsäuren in der Hitze ebenfalls verestert. n-Hexan wurde durch Erhitzen im Wasserbad aus den Kugelrohren ausgetrieben, die Fettsäuremethylester wurden im Hochvakuum (10^{-3} Torr) bei 100 - 150 C destilliert.

Das so gereinigte Fettsäuremethylestergemisch wurde mit einer Kombination von Gaschromatograph-Massenspektrometer, LKB 9 000 quantitativ und qualitativ analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Wachstumsparameter

ED-0,15-Zellen wurden in vitro in Medium mit hoher Glucosekonzentration inkubiert. Bei einer Inkubation mit 50 mg/ml Glucose im Kulturmedium verlangsamte sich die Zunahme an Protein pro Gesamtkultur (Abb. 3, Kurve B). Bei einer Glucosekonzentration von 100 mg/ml verringerte sich das Wachstum von Ascites-Zellen fast bis zum Stillstand (Abb. 3, Kurve D), und bei längerer Inkuba-

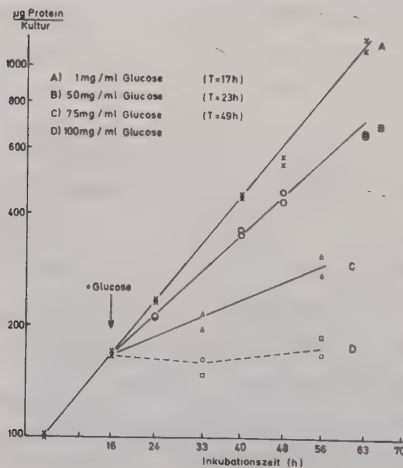
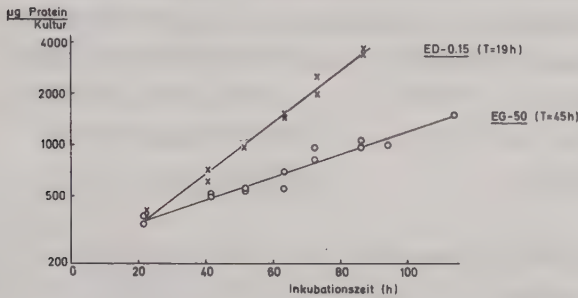


Abb. 3: Einfluß unterschiedlicher Glucosekonzentrationen auf das Wachstum von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (ED-0,15) in Zellkultur.

Glucosezugabe erfolgte 16 h nach Mediumwechsel;
T= Verdopplungszeit

tion (nach etwa 3 Tagen) kam es zum Absterben dieser Zellen. Es war jedoch möglich, Ehrlich-Ascites-Zellen auch in Langzeit-Kultur (länger als ein Jahr) in Gegenwart folgender Glucosekonzentrationen zu züchten und zu subkultivieren (SCHACHTSCHABEL, unveröffentlichte Resultate): 50 mg/ml ("EG-50-Zellen")(Wachstumskurve: s. Abb. 4), 65 mg/ml ("EG-65-Zellen"), 75 mg/ml ("EG-75-Zellen"). Solche EG-75-Zellen konnten auch über mehrere Wochen in einem

Abb. 4: Wachstumskurven von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen vor (ED-0, 15-Zellen) und nach "Adaptation" an Kulturmedien mit erhöhtem Glucose-Gehalt (EG-50-Zellen).



Nährmedium mit einer Glucose-Konzentration von 100 mg/ml am Leben erhalten werden.

Proteingehalt

Die Bestimmung des zellulären Proteingehalts von ED-0, 15-, EG-50-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen wurde routinemäßig über einen Zeitraum von einem Jahr durchgeführt. Der Proteingehalt (Tab. 3) von EG-65-Zellen war, verglichen mit ED-0, 15-Zellen erhöht;

Tab. 3: Proteingehalt von ED-0, 15-, EG-50-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen.

Zellart	(n)	$\mu\text{g Protein/ } 10^6 \text{ Gesamtzellen}$
ED-0, 15	10	207 $\pm$ 53
EG-50	10	443 $\pm$ 100
EG-65	10	273 $\pm$ 178
ED-in vivo	10	150 $\pm$ 34

verglichen mit ED-0,15-Zellen war der Proteingehalt von EG-50-Zellen etwa auf das Doppelte, und derjenige von EG-65-Zellen um etwa 30 % erhöht. Allerdings waren die Schwankungen zwischen den Einzelbestimmungen beträchtlich. Wahrscheinlich ist dies auf die "besondere Fragilität" der EG-65-Zellen zurückzuführen. Der Proteingehalt von ED-in vivo-Zellen war um etwa 25 % gegenüber ED-0,15-Zellen vermindert.

DNA / RNA - Gehalt

Der DNA-Gehalt von EG-50-Zellen, verglichen mit ED-0,15-Zellen, war etwa doppelt so hoch (Tab. 4) und entspricht somit dem erhöhten Proteingehalt von EG-50-Zellen (Tab. 3); entsprechend waren die Quotienten Prot. /DNA annähernd gleich.

Tab. 4: DNA- und RNA-Gehalt von ED-0,15-, EG-50- und ED-in vivo-Zellen ($\mu\text{g}/10^6$ Zellen).

Zellart	(n)	DNA		RNA		$\frac{\text{DNA}}{\text{RNA}}$	$\frac{\text{Prot.}}{\text{DNA}}$	$\frac{\text{Prot.}}{\text{RNA}}$
ED-0,15	7	8,95	$\pm 0,9$	21,12	$\pm 2,4$	0,42	23,1	9,8
EG-50	7	18,28	$\pm 0,3$	36,60	$\pm 0,4$	0,49	24,3	12,1
ED-in vivo	7	11,86	$\pm 1,5$	20,73	$\pm 1,7$	0,57	17,5	12,6

Der RNA-Gehalt von EG-50-Zellen war gegenüber ED-0,15-Zellen signifikant erhöht. Der Quotient Prot. /RNA war ebenfalls erhöht; das bedeutet, der RNA-Gehalt von EG-50-Zellen, bezogen auf den Proteingehalt, ist gegenüber ED-0,15-Zellen erniedrigt. ED-in vivo-Zellen enthielten mehr DNA als ED-0,15-Zellen; Prot. /DNA war erniedrigt. Der RNA-Gehalt von ED-in vivo-Zellen war nicht signifikant erhöht, eine Erhöhung des Prot. /RNA-Quotienten war jedoch vorhanden.

3.2. Energiestoffwechsel

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs und die Bestimmung der Laktatbildung von ED-Zellen erlauben, Aussagen über den Energiestoffwechsel zu machen.

3.2.1. Der Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch von EG-50-Zellen, bezogen auf 10^6 lebende Zellen war gegenüber ED-0,15-Zellen deutlich erhöht (63 %);

Tab. 5: O_2 -Verbrauch von ED-0,15-, EG-50-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen.

Zellart	(n)	$\mu l O_2 / 10^6$ Zellen x h		$\mu l O_2 / mg$ Prot x h		trypanblau- % positiv
		total	lebend			
ED-0,15	11	2,54 $\pm$ 0,8	2,69 $\pm$ 0,8	13,0 $\pm$ 3,9		5,4
EG-50	6	6,60 $\pm$ 0,8	7,33 $\pm$ 0,95	16,54 $\pm$ 2,14		10,0
EG-65	11	2,48 $\pm$ 2,0	3,54 $\pm$ 2,8	13,0 $\pm$ 10,3		30,0
ED-in vivo	8	3,1 $\pm$ 0,35	3,11 $\pm$ 0,35	20,7 $\pm$ 2,3		0,39

Meßmedium: Earles-Salzlösung

bei EG-50 : Earles Salz + 50 mg/ml Glucose

bei EG-65 : Earles Salz + 65 mg/ml Glucose

bezogen auf das Gesamtprotein der Zellen betrug die Steigerung 21 %. Der gemessene O_2 -Verbrauch bei EG-65 -Zellen lag nur wenig über den Werten von ED-0,15-Zellen; bezogen auf mg Protein war kein Unterschied meßbar. ED-in vivo-Zellen wiesen die höchste Atmungsaktivität auf.

Der zelluläre Sauerstoffverbrauch von EG-65-Zellen entsprach dem Sauerstoffverbrauch von ED-0,15-Zellen.

Die hohe Anzahl von 30 % trypanblau-gefärbten Zellen war ein Hinweis dafür, daß EG-65-Zellen gegenüber EG-50-Zellen während der Aufarbeitung stärker "geschädigt" waren.

3.2.2. Laktatbildung

Vergleichende Bestimmungen der Laktatgehalte im Nährmedium von ED-0,15-Zellen und EG-50-Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase ergab eine Erhöhung der Laktatproduktion bei EG-50-Zellen um 45 % (Tab. 6), wenn man diese Produktion auf das Wachstum ("neugebildetes Protein") bezieht.

Tab. 6: Laktatbildung von ED-0,15-Zellen und EG-50-Zellen

Zellart	Glucose (mg/ml)	Laktat (mg/ 100 µg Prot.)
ED-0,15	1	1,18 ± 0,08
EG-50	50	2,16 ± 0,11

Da die Wachstumsrate bei EG-50-Zellen jedoch um die Hälfte verringert ist (Abb. 3), ist die effektive Laktatproduktion pro Zeiteinheit von EG-50-Zellen gegenüber ED-0,15-Zellen nicht erhöht.

3.2.3. Einfluß unterschiedlicher Inkubationsmedien auf den Sauerstoffverbrauch

Der zelluläre Sauerstoffverbrauch wurde unter Bedingungen eines unterschiedlichen extrazellulären Ionen-und Zucker-Milieus gemessen, und zwar:

- 1) in verschiedenen Salzlösungen,
- 2) in verschiedenen Zuckerlösungen,

- 3) im Kulturmedium (Eagles Basalmedium + 10 % fötales Kalbsserum),
- 4) in Medium mit erhöhter Glucosekonzentration
- 5) in Medium mit erniedrigter Salzkonzentration

3.2.3.1. Verschiedene Salzlösungen

ED-in vivo-Zellen wurden mit Tris 0,1 M, pH 7,3, Earles Salz-, Tyrode-, Locke-, Ringer A- und Ringer B-Lösung inkubiert. Der O_2 -Verbrauch von ED-in vivo-Zellen unterschied sich, trotz der unterschiedlichen Salzkomponenten der physiologischen Lösungen, nicht; eine Ausnahme bildete der O_2 -Verbrauch in Earles Salz-Lösung, der leicht erhöht war (Tab. 7).

Tab. 7: Einfluß verschiedener Salzlösungen auf den O_2 -Verbrauch von ED-in vivo-Zellen

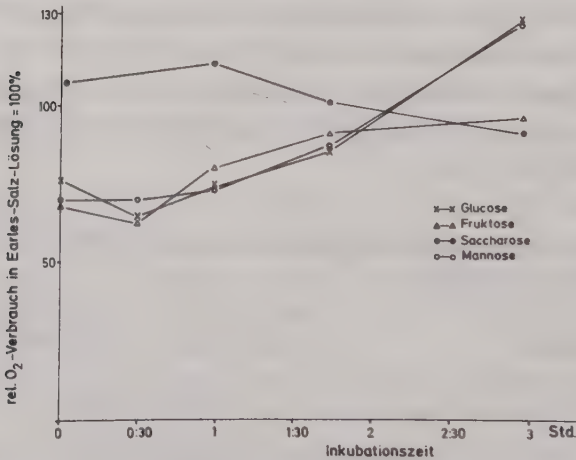
Inkubationsmedien	$\mu l O_2 / 10^6$ lebende Zellen
Earles Salz	3,03 $\pm$ 0,96
Tyrode	2,14 $\pm$ 1,0
Locke	2,54 $\pm$ 1,3
Tris 0,1 M, pH 7,3	2,48 $\pm$ 1,3
Ringer A	2,51 $\pm$ 1,13
Ringer B	2,53 $\pm$ 1,2

Zellzahl: 10^6 Zellen/ml Ansatz
 Anteil trypanblau-gefärbter Zellen: 7 %
 Inkubation: 20 Min., 37 C

3. 2. 3. 2. Einfluß von Glucose, Fructose, Saccharose und Mannose auf den O_2 -Verbrauch.

ED-in vivo- Zellen wurden in Earles Salz-Lösung mit je 10 mg/ml Glucose, Fructose, Mannose bzw. 20 mg/ml Saccharose inkubiert.

Abb. 5: Einfluß verschiedener Zucker auf den O_2 -Verbrauch von ED-in vivo-Zellen.



Kontrolle (100%) : Earles Salz-Lösung

Zuckerkonzentration: Glucose, Fructose, Mannose - 10 mg/ml

Saccharose - 20 mg/ml

Zellzahl : 4×10^6 /ml

ED-in vivo- Zellen wurden in Earles Salzlösung (E. S.) gewaschen und danach in E. S. -Lösung mit den angegebenen Zuckern suspendiert; die Zellsuspension (Gesamt volumen 12 ml), wurde in Zellkulturflaschen überführt; durch vorsichtiges Bewegen im Schüttelwasserbad wurden die Zellen in Suspension gehalten; an der Oberfläche der Suspension erfolgte eine Begasung mit 7% CO_2 , 20% O_2 , 73% N_2 . Für die Messung wurden 1,8 ml der Zellsuspension entnommen.
Inkubations- und Meßtemperatur : 37 C.

Die Messung wurde nach einem Zeitraum von 3 Std beendet, da zu diesem Zeitpunkt die Anzahl an trypanblaugefärbten Zellen unter

allen Inkubationsbedingungen auf 10 % anstieg.

Glucose, Fructose und Mannose verhielten sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf den O_2 -Verbrauch ähnlich. In Anwesenheit dieser Zucker lag der O_2 -Verbrauch in der ersten Stunde der Inkubation etwa 30 % unter den Kontrollwerten (Abb. 5). Nach einer Stunde begann der O_2 -Verbrauch zu steigen, erreichte nach etwa 2 Stunden die Atmungs-raten des Kontrollwertes, der im Falle der Glucose- und Mannose-inkubierten Zellen nach 3 Std. signifikant überschritten wurde (Abb. 5). Allerdings ist dieser Anstieg nur relativ, und nicht absolut (pro lebende Zelle) feststellbar, denn nach 3 Std. ist der Bezugswert (Zellen in Earles Salz-Lösung ohne Zucker) um etwa 20 - 30 % vermindert.

Während der O_2 -Verbrauch von ED-in vivo-Zellen nach einer Inkubationszeit von 1,5 Std. oder 3 Std. in Gegenwart von 20 mg/ml Saccharose nur geringfügig verändert war (Abb. 5), war interessanterweise der O_2 -Verbrauch von ED-0,15-Zellen nach kurzzeitiger Inkubation in Gegenwart von 10 - 200 mg/ml Saccharose deutlich erhöht (Abb. 6 A); allerdings hatte sich der O_2 -Verbrauch nach 1,5 stündiger Inkubation bei einer Konzentration bis zu 100 mg/ml den Kontrollwerten (in Earles Salz-Lösung ohne Saccharose) angeglichen. Bei einer Konzentration von 200 mg/ml kam es im Falle der ED-0,15-Zellen bereits nach 1,5 stündiger Inkubation zu einer mehr als 50 %igen Verminderung des O_2 -Verbrauchs, welches auf eine Schädigung der Zellen (ersichtlich aus dem Anstieg des Trypanblau-Wertes) in diesem hypertonen Milieu zurückzuführen ist. Auch etwa 90 % der ED-in vivo-Zellen wurden nach 3 stündiger Inkubation in Gegenwart von 200 mg/ml und auch 100 mg/ml Saccharose "geschädigt" (Abb. 7), was aus dem Abfall des Sauerstoffverbrauchs und dem Anstieg der Trypanblau-Färbbarkeit (Abb. 7) zu ersehen ist.

Abb. 6 A: Einfluß von Saccharose auf den O_2 -Verbrauch von ED-0, 15-Zellen.
Inkubationszeit: 15 Min.

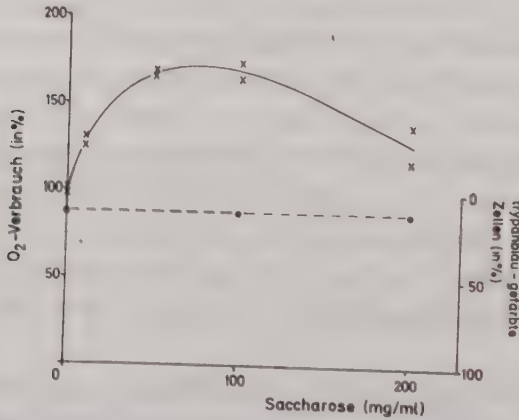
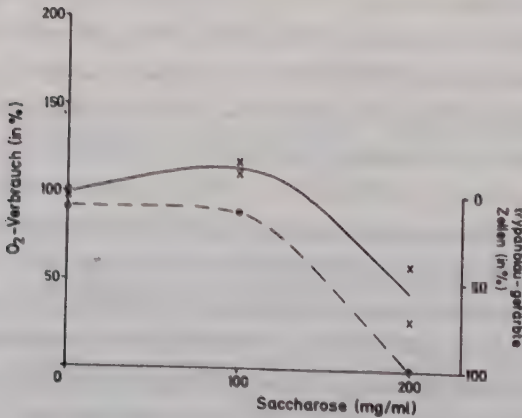


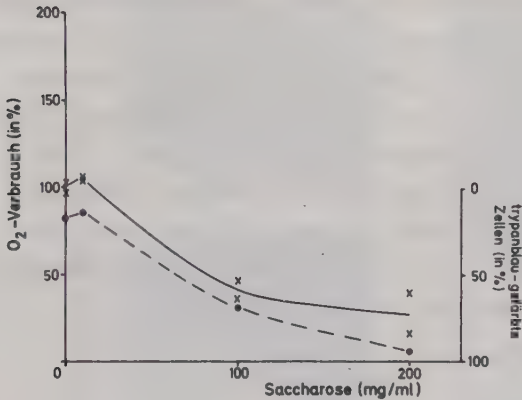
Abb. 6 B: Einfluß von Saccharose auf den O_2 -Verbrauch von ED-0, 15-Zellen.
Inkubationszeit: 1,5 Std.



O_2 -Verbrauch der Zellen in E. S. -Lösung = 100 %
Zellzahl: 10^6 /ml; Zellen wurden in E. S. -Lsg. gewaschen, A) in Meßmedium (E. S. -Lsg.) mit Saccharose aufgenommen, B) Inkubation in E. S. -Lsg. mit Saccharose bei 37 C unter Begasung (s. Abb. 5).
x—x : O_2 -Verbrauch ; ●—● : Trypanblaufärbung

Abb. 7: Einfluß von Saccharose auf den O_2 -Verbrauch von ED-in vivo-Zellen.

Inkubationszeit: 3 Std.



O_2 -Verbrauch der Zellen in E. S. -Lösung = 100 %

Zellzahl: 10^6 /ml; Zellen wurden in E. S. -Lösung gewaschen, Inkubation in E. S. -Lsg. mit Saccharose bei 37 C unter Begasung (s. Abb. 5).

x — x : O_2 -Verbrauch ; • — — — • : Trypanblaufärbung

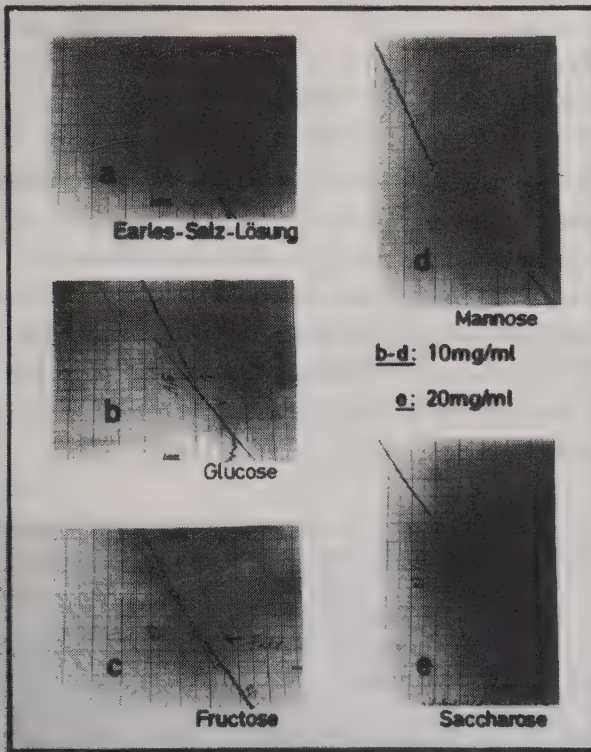
Bemerkenswert war die Tatsache, daß ein geringer O_2 -Verbrauch trotz Trypanblaufärbung aller Zellen noch vorhanden war (Abb. 6 B, Abb. 7). Dies steht im Widerspruch zu den Befunden von EATON (1959), der in seinen Experimenten bei trypanblau-gefärbten Zellen keinerlei O_2 -Verbrauch mehr zeigen konnte.

Es ist bekannt, daß Glucose, Fructose und Mannose von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen metabolisiert werden und einen Crabtree-Effekt bewirken (KUN und MITARB., 1951; BRIN und MC KEE, 1956; IBSEN, 1961). Saccharose wird nicht metabolisiert (MORGAN und MORTON, 1960). Über den Einfluß von Saccharose auf den O_2 -Verbrauch von Zellen ist wenig bekannt.

Wie aus Abb. 5 ersichtlich ist, war der O_2 -Verbrauch in Gegenwart von 10 mg/ml Glucose, Fructose und Mannose während einer 1 stündigen Inkubationszeit deutlich vermindert.

Die genaue Kinetik dieser Hemmung wurde in einem anderen Experiment gezeigt. Die Original-Aufzeichnung der Hemmung unmittelbar nach Zugabe der Zucker zeigt Abb. 8: Glucose (25 % Hemmung), Mannose (25 % Hemmung) und Fructose (4,4 % Hemmung); Saccharose stimulierte den O_2 -Verbrauch um etwa 7 % (Abb. 8, Tab. 8). Nach einer Inkubationszeit von 1 Std waren die Hemmraten verringert (s. auch Abb. 5) : Glucose, Mannose und Fructose hemmten den O_2 -Verbrauch um 11,4 %; Saccharose bewirkte eine Stimulierung der Atmung um 13,6 % (Tab. 8).

Abb. 8 ; Tab. 8 : Zeitlicher Verlauf des O_2 -Verbrauchs von ED-in vivo-Zellen in Gegenwart verschiedener Zucker



Lösungen	% Initial-hemmung ^x	O ₂ -Verbrauch nach 1 h Inkub.	
		μl O ₂ /h · 10 ⁶ Zell.	in %
a) E. S. -Lsg - Glucose	0	2,64	100
b) E. S. -Lsg + Glucose	25,0	2,34	88,6
c) E. S. -Lsg + Mannose	25,2	2,34	88,6
d) E. S. -Lsg + Fructose	4,35	2,34	88,6
e) E. S. -Lsg + Saccharose	-6,9	3,0	113,6

Zu 1,5 ml Zellsuspension in E. S. -Lsg wurden 0,2 ml Zuckerlösung gegeben. Endkonz.: b - d: 10 mg/ml; e: 20 mg/ml. Kontrolle a: E. S. -Lsg. Zellzahl: 6×10^6 Zell./ml. Schreibgeschwindigkeit: 5 cm/Min. Pfeil: Zugabe der Lösung (Zucker, E. S. -Lsg). (n = 4)

^x während der ersten 2 Min.

3. 2. 3. 3. O₂-Verbrauch in Eagles Basalmedium

Eagles Basalmedium (Abb. 1) enthält Vitamine und neben Glucose mehrere Aminosäuren, die als Atmungssubstrate von der Zelle verwendet werden können (DICKENS und GREVILLE, 1933; KOVA-CEVIC und MORRIS, 1972; KRAUSE, 1973), während Earles Salz nur die in Eagles Basalmedium vorhandenen Salze und Glucose enthält (Tab. 1; 2)

Der O₂-Verbrauch von ED-0,15-Zellen und ED-in vivo-Zellen wurde vergleichend in Earles Salz-Lösung und Eagles Basalmedium gemessen, ohne im einzelnen nachzuprüfen, welche Komponenten des Mediums eine mögliche Veränderung der Atmungsraten bewirkten. Bei den Meßmedien wurde Glucose in einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt.

Tab. 9: O₂-Verbrauch in Earles Salz-Lösung und Eagles Basalmedium (BME) (mit 1 mg/ml Glucose)

$\mu\text{l O}_2/10^6$ lebende Zellen x Std				
Zellart	Earles Salz	(n)	BME	(n)
ED-0,15	3,45 $\pm$ 0,2	(8)	3,68 $\pm$ 0,4	(11)
ED-in vivo	3,15 $\pm$ 0,4	(15)	3,38 $\pm$ 0,6	(16)

Inkubationszeit: 30 Min , 37 C

Zellzahl: 2 x 10⁶ Zellen

Anteil trypanblau-gefärbter Zellen: 10 %

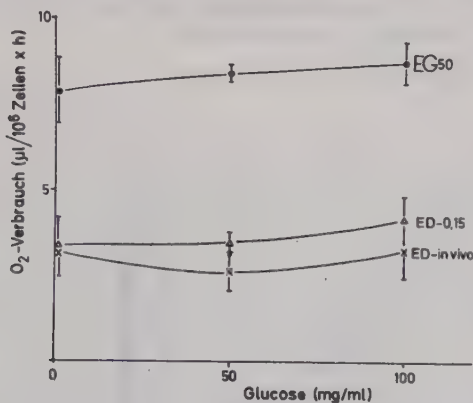
Der O₂-Verbrauch von ED-0,15- und ED-in vivo-Zellen war nach Inkubation von 30 Min. im Basalmedium leicht erhöht (6 %). Diese Erhöhung kann nicht als signifikant angesehen werden. Im Prinzip besteht somit kein Unterschied im O₂-Verbrauch von diesen Zellen in Eagles Basalmedium und in Earles Salz-Lösung.

3.2.3.4. O_2 -Verbrauch von ED-0,15-, EG-50- und ED-in vivo-Zellen in Earles Salz-Lösung mit 1, 50, 100 mg/ml Glucose

ED-0,15-, EG-50- und ED-in vivo-Zellen wurden mit 1, 50 und 100 mg/ml Glucose in Earles Salz-Lösung inkubiert. Der O_2 -Verbrauch wurde während einer Inkubationszeit von 15 Min. gemessen.

Die untersuchten Zellen zeigten im O_2 -Verbrauch keine signifikanten Veränderungen, auch in Gegenwart dieser hohen Glucose-Konzentrationen (Abb. 9).

Abb. 9: O_2 -Verbrauch von ED-0,15-, EG-50- und ED-in vivo-Zellen in Earles Salz-Lösung mit 1, 50 und 100 mg/ml Glucose



Zellzahl: 2×10^6 Zellen/ml

Durchführung der Messung: Messung sofort nach Überführung der Zellen in Earles Salz-Lösung mit Glucose

Meßzeit: 15 Min.

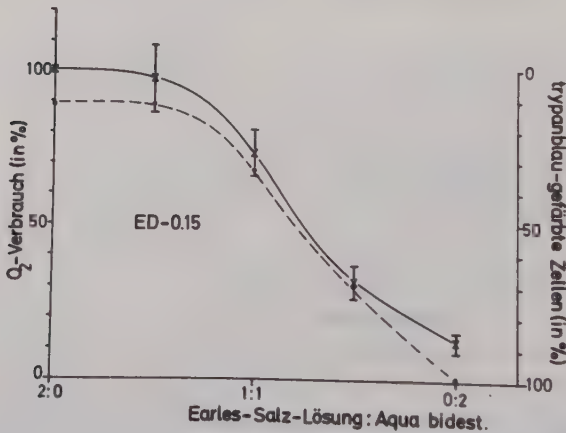
Die erhöhte Atmungsrate von EG-50-Zellen im Vergleich zu ED-0,15- und ED-in vivo-Zellen wurde in Tab. 5 bereits angesprochen.

3.2.3.5. Hypotone Medien

Werden Säugetierzellen hypoton behandelt, schwellen sie zunächst an und platzen im allgemeinen nach einer gewissen Zeit. Der Zeitpunkt des Platzens hängt ab von der Fragilität der Zellmembranen.

Der O_2 -Verbrauch von ED-0,15-Zellen, ED-in vivo-Zellen und EG-50-Zellen in hypotoner Earles Salz-Lösung wurde vergleichend untersucht. ED-0,15-Zellen zeigten bei einer Verdünnung der physiologischen Salzlösung mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:1 eine deutliche Abnahme des O_2 -Verbrauchs, wobei ein Anstieg an trypanblau-gefärbten Zellen eintritt (Abb. 10).

Abb. 10: O_2 -Verbrauch und Trypanblaufärbung von ED-0,15-Zellen in hypertonen Medien

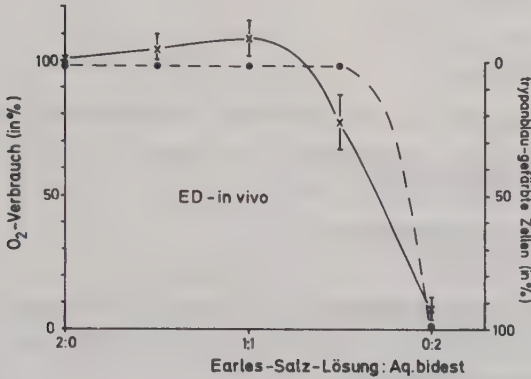


x—x: O_2 -Verbrauch; •- - -•: Trypanblaufärbung.

Messung: sofort nach Überführung der Zellen in hypotones Medium
Meßmedium: Earles Salz-Lösung : Aqua bidest. ; Meßzeit: 15 Min .

Im Gegensatz zu ED-0,15-Zellen wurde der O_2 -Verbrauch von ED-in vivo-Zellen bei einer 1:1-Verdünnung mit Aqua bidest. stimuliert und der Anteil an trypanblau-gefärbten Zellen blieb unverändert (Abb. 11).

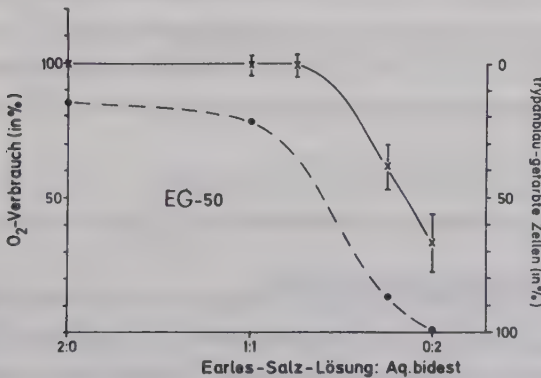
Abb. 11: O_2 -Verbrauch und Trypanblaufärbung von ED-in vivo-Zellen in hypertonen Medien



x—x: O_2 -Verbrauch; •—•: Trypanblaufärbung.
Messung: s. Abb. 9
Meßmedium: s. Abb. 9

EG-50-Zellen zeigten eine geringe Abnahme des O_2 -Verbrauchs und eine ebenso geringe Zunahme der trypanblau-gefärbten Zellen (Abb. 12) bei gleicher Verdünnung (1:1).

Abb. 12: O_2 -Verbrauch und Trypanblaufärbung von EG-50-Zellen in hypertonen Medien



x—x: O_2 -Verbrauch; •—•: Trypanblaufärbung.
Messung: s. Abb. 9
Meßmedium: s. Abb. 9

Eine Abnahme des O_2 -Verbrauchs um 50 % trat bei den verschiedenen Zellen bei folgendem Verdünnungs-Verhältnis Earles Salz-Lösung / Aqua bidest. ein :

ED-0,15-Zellen = 0,75 : 1,25;

ED-in vivo-Zellen = 0,15 : 1,85;

EG-50-Zellen = 0,2 : 1,8.

Eine 50 %ige Trypanblaufärbung der Zellen trat bei folgendem Verdünnungs-Verhältnis Earles Salz-Lösung / Aqua bidest ein :

ED-0,15-Zellen = 0,75 : 1,25;

ED-in vivo-Zellen = 0,3 : 1,7;

EG-50-Zellen = 0,5 : 1,5.

Somit war eine Schädigung der Zellen unter hypotonen Bedingungen am stärksten bei ED-0,15-Zellen; ED-in vivo-Zellen und EG-50-Zellen zeigten sich unempfindlicher.

3.3. Enzymaktivitäten von ED-0,15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen

Neben Aktivitätsbestimmungen von Schlüsselenzymen des Kohlenhydratstoffwechsels wurden die spezifischen Aktivitäten von NADPH-abhängigen Enzymen, der $Na^+ - K^+$ -ATPase und dem lysosomalen Enzym "saure Phosphatase" bestimmt. Die Enzymbestimmungen wurden mit dem Gesamthomogenat der Zellen durchgeführt. Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten sind aus dem Enzymmuster von ED-0,15-Zellen, EG-65-Zellen und ED-in vivo-Zellen zu ersehen (Abb. 13).

Es fiel auf, daß die Aktivitäten der Enzyme von ED-in vivo-Zellen stets höher als die Aktivitäten von ED-0,15- und EG-65-Zellen waren.

EG-65-Zellen wiesen eine erhöhte Aktivität vor allem der NADPH-abhängigen Enzyme: der Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH), der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) und der Gluconsäure-6-Phosphat-Dehydrogenase ($_6G$ -P-DH) auf. Erniedrigt oder unver-

ändert im Vergleich zu ED-0,15-Zellen waren bei EG-65-Zellen die Schlüsselenzyme des Kohlenhydratstoffwechsels: Hexokinase (HK), Hexose-Phosphat-Isomerase (HIM), Fructose-6-Phosphat-Kinase (F_6 -P-K), Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Pyruvat-Kinase (PK); ebenfalls nicht signifikant verändert waren Aldolase (Ald), Laktat-Dehydrogenase (LDH), Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GDH), die Transaminasen Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und die Malat-Dehydrogenase (MDH). Na^+ - K^+ -ATPase und saure Phosphatase von EG-65-Zellen zeigten keine veränderte Aktivität.

3.4. Glycosaminoglycane

Die Glycosaminoglycan-Synthese von ED-0,15-, ED-0,35-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen wurde durch Einbau von ^{14}C -Glucosamin in die isolierten und elektrophoretisch getrennten Glycosaminoglycane nachgewiesen. Mit der verwendeten Methode konnte Hyaluronsäure (Hy), Chondroitin-Sulfat -A, -B und -C identifiziert werden (Abb.2,14). Es wurden sowohl die zellulären (intrazellulär und perizellulär) als auch die von den Zellen in das Kulturmedium abgegebenen (extrazellulären) Glycosaminoglycane bestimmt.

Die Einbauraten ergaben (Tab. 10), daß ED-0,15-Zellen im Vergleich mit den anderen Zellen mehr ^{14}C -Glucosamin in Glycosaminoglycane pro Zeiteinheit eingebaut haben (2170 counts/ mg Prot. x h); der extrazelluläre Gehalt betrug 2035 counts.

ED-0,35-Zellen enthielten in den Zellen nur etwa 25 % der Einbauraten im Vergleich mit den Raten von ED-0,15-Zellen; der extrazelluläre Glycosaminoglycan-Gehalt im Kulturmedium war jedoch leicht erhöht. ED-in vivo-Zellen wiesen weniger als 10 % der Einbauraten von ED-0,15-Zellen auf; im Kulturmedium wurde ebenfalls ein ver-

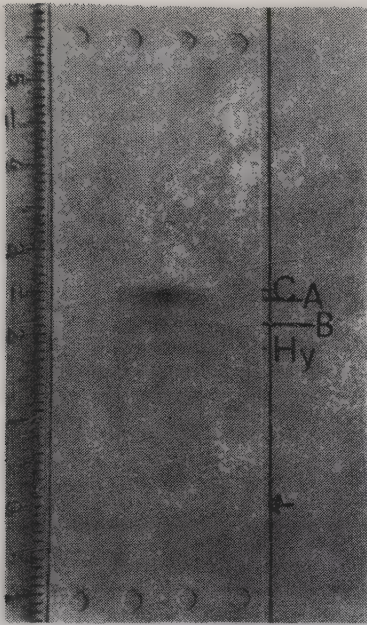


Abb. 14: Elektrophoretische Auftrennung von Glycosaminoglycanfraktionen.

C :Chondroitin-Sulfat C
A :Chondroitin-Sulfat A
B :Chondroitin-Sulfat B
Hy :Hyaluronsäure
← :Start

minderter Gehalt nachgewiesen.

EG-65-Zellen zeigten die niedrigsten Einbauraten, sowohl in den Zellen, als auch im Kulturmedium. Die prozentuale Verteilung der Glycosaminglycane zeigt jedoch (Tab. 10), daß EG-65-Zellen einen relativ höheren Prozentsatz an sulfatierten Glycosaminoglycanen (Chondroitin-Sulfat A, B und C), verglichen mit ED-0,15-Zellen aufweisen; Hyaluronsäure ist relativ vermindert vorhanden.

Im Falle von ED-0,35-Zellen wurde ein relativ höherer Anteil (etwa 80 % im Vergleich mit etwa 50 % bei ED-0,15-Zellen) im Kulturmedium als in den Zellen selbst gefunden; jedoch war der Hyaluronsäureanteil im Kulturmedium von ED-0,35-Zellen erhöht.

Tab. 10: Einbau von ^{14}C -Glucosamin in Glycosaminoglycane (GAG) und relative intra- und extrazelluläre Verteilung dieser markierten Glycosaminoglycane.

Zellart	Kulturmedium			Zellen		
	$\frac{\text{counts}}{\text{mg Zellprot x 16 h}}$	% Verteilung		$\frac{\text{counts}}{\text{mg Zellprot x 16 h}}$	% Verteilung	
		Hy	ChS-B -A -C		Hy ChS-B -A -C	
ED-0,15	2035	54	39 5 2	2170	56 32 11 1	-66-
EG-65	273	12	35 34 19	113	26 62 12 -	-66-
ED-0,35	2407	70	20 10 -	527	43 - 28 29	
ED-in vivo	1150	48	47 6 -	171	75 20 5 -	

Hy = Hyaluronsäure
 ChS-B = Chondroitin-Sulfat B
 -A = Chondroitin-Sulfat A
 -C = Chondroitin-Sulfat C
 Angaben in % vom Gesamteinbau

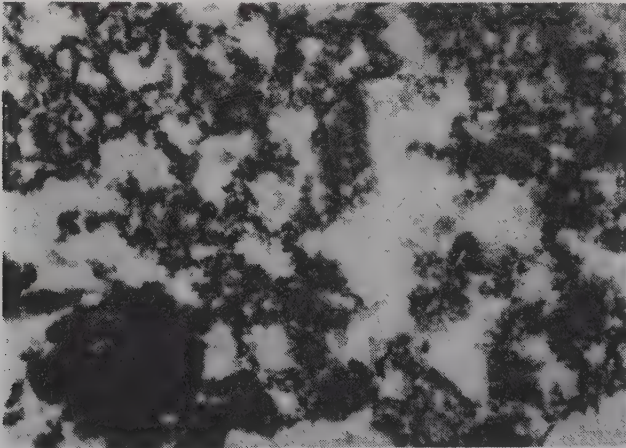
n = 4

3.5. Isolierung von Plasmamembranen

Die Methode von WARREN, GLICK, NASS (1966) unter Anwendung von ZnCl_2 (s. 2.6.1.1.) zur Isolierung von Plasmamembranen führte zu keiner "reinen" Membranfraktion (Abb. 15).

Bei dieser Methode waren alle Zellbestandteile nach dem Homogenisieren und nach Behandlung mit ZnCl_2 miteinander verklumpt.

Abb. 15: "Plasmamembranfraktion" von ED-in vivo-Zellen, Isolierung nach WARREN und MITARB. .



Vergrößerung: 15 000 fach
Fixierung: OsO_4 in Glutaraldehyd
Kontrastierung: Pb

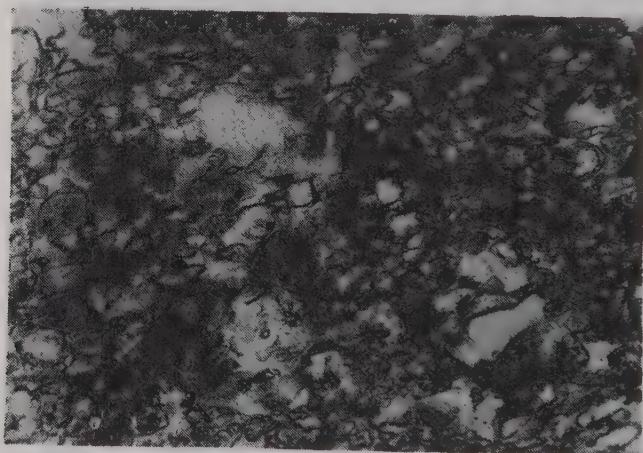
Eine Ablösung der cytoplasmatischen Bestandteile der Plasmamembranfraktionen, wie von WARREN und MITARB. im Falle von Mäusel-Zellen beschrieben, konnte auch nach intensivem Bemühen im Falle der Ehrlich-Ascites-Tumorzellen nicht erreicht werden.

Bei der Homogenisation ergaben sich größte Schwierigkeiten: nach Fixierung der Zellen mit ZnCl_2 war eine Zellzerstörung mit einem Dounce-

Homogenisator kaum möglich. Nach intensiver Anwendung eines Potter-Elvehjem-Homogenisators waren Zellkerne möglicherweise ebenfalls zerstört; durch Freiwerden von sauren Nucleoproteinen war eine Verklumpung des Zellmaterials unvermeidlich.

Die Methode der Membranisolierung nach FORTE, FORTE und HEINZ (1973) (siehe 2.6.1.2.) war für Ehrlich-Ascites-Tumorzellen ohne größere Schwierigkeiten verwendbar. Die elektronenmikroskopisch dargestellte Membranfraktion von ED-in vivo-Zellen (Abb. 16) war jedoch

Abb. 16: Plasmamembranfraktion von ED-in vivo-Zellen
Isolierung nach FORTE, FORTE und HEINZ (1973).



Vergrößerung: 15 000 fach
Fixierung: OsO₄
Kontrastierung: Pb (15 Min.)

nicht ausreichend homogen: Sie enthielt neben Plasmamembranen viel granuläres Material als cytoplasmatische Verunreinigung. Deshalb wurde auch diese Methode, trotz versuchter Variation, als unbefriedigend angesehen.

Aus diesem Grund wurde auf eine weitere, zwar ältere, Methode (BOONE und MITARB., 1969) (siehe 2.6.1.3.) für die Isolierung von Plasmamembranen zurückgegriffen, die letztlich im Vergleich mit den beiden anderen Methoden die besseren Ergebnisse zeitigte.

Nach Isolierung von Plasmamembranen aus ED-in vivo-Zellen wurden nach der modifizierten Methode von BOONE und MITARB. (1969) im Saccharose-Gradienten vier Banden erhalten:

Bande 1 : 30 - 33 % (w/w) Saccharose

Bande 2 : 33 - 36 % (w/w) Saccharose

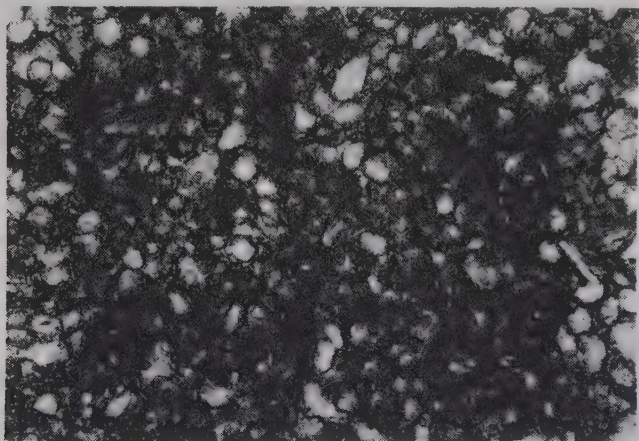
Bande 3 : 36 - 38 % (w/w) Saccharose

Bande 4 : 38 - 42 % (w/w) Saccharose

Die Banden wurden elektronenmikroskopisch untersucht und durch Aktivitätsmessungen von Marker-Enzymen auf ihre Reinheit überprüft.

Bande 1 (30 - 33 % (w/w)) enthielt überwiegend Plasmamembranen;

Abb. 17 A: Plasmamembranen von ED-in vivo-Zellen,
Isolierung nach BOONE und MITARB. (1969),
Bande 1 : 30 - 33 % (w/w).



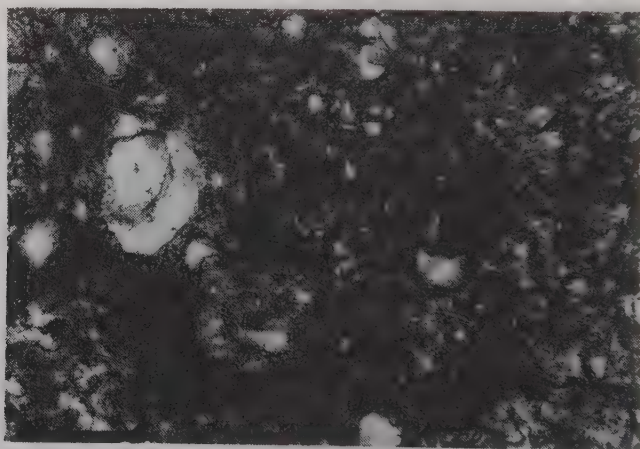
Vergrößerung: 15 000 fach

Fixierung: OsO₄

Kontrastierung: Pb⁴ (15 Min.)

Verunreinigungen durch Mitochondrienmembranen waren elektronenoptisch nicht nachzuweisen, sie können jedoch nicht ausgeschlossen werden (s. Lipidspektrum Tab. 12). Abb. 17 A zeigt einen Querschnitt aus der Bande 1; sie besteht überwiegend aus Membranvesikeln. Der geschätzte Durchmesser dieser Vesikel beträgt $1570 \pm 430 \text{ \AA}$.

Abb. 17 B: Plasmamembranen und Mitochondrien von ED-in vivo-Zellen, Isolierung nach BOONE und MITARB. (1969),
Bande 2 : 33 - 36 % (w/w).



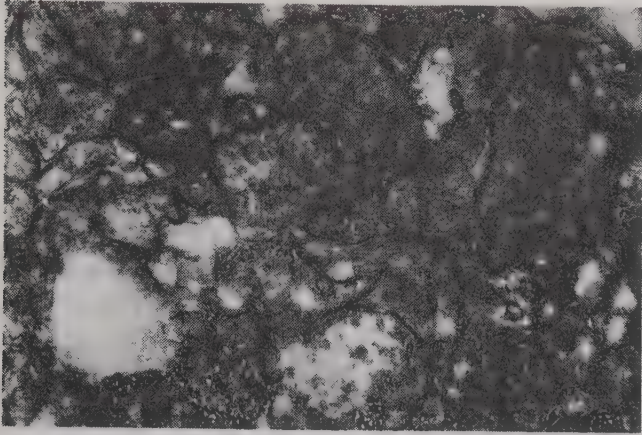
Vergrößerung: 15 000 fach
Fixierung: OsO_4
Kontrastierung: Pb^{4+} (15 Min.)

Bande 2 (33 - 36 % (w/w)) enthielt Membranvesikel und Mitochondrien-Bruchstücke (Abb. 17 B).

Bande 3 (36 - 38 % (w/w)) enthielt überwiegend Mitochondrien oder Mitochondrien-Bruchstücke (Abb. 17 C).

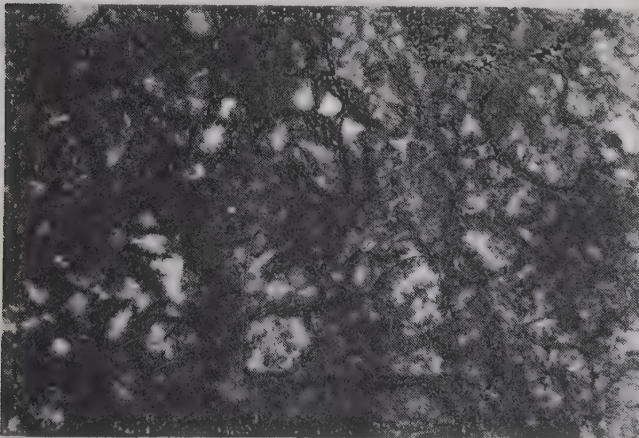
Bande 4 (38 - 42 % (w/w)) enthielt Mitochondrien und zelluläres Material (Abb. 17 D).

Abb. 17 C: Mitochondrien und Mitochondrien-Bruchstücke von ED-in vivo-Zellen, Isolierung nach BOONE und MITARB. (1969), Bande 3 : 36 - 38 % (w/w).



Vergrößerung: 15 000 fach
Fixierung: OsO₄
Kontrastierung: Pb⁴ (15 Min.)

Abb. 17 D: Mitochondrien und zelluläres Material von ED-in vivo-Zellen, Isolierung nach BOONE und MITARB. (1969), Bande 4 : 38 - 42 % (w/w).



Legende siehe Abb. 17 C

Tab. 11: Enzymatische Aktivitäten verschiedener Plasmamembranfraktionen von ED-in vivo-Zellen

Fraktion	Saccharose (%) (w/w)	(n)	Protein (μ g)	5'-Nucleot. $\frac{\mu\text{Mol P}_i}{\text{mg Prot} \cdot \text{h}}$	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ $\frac{\mu\text{Mol P}_i}{\text{mg Prot} \cdot \text{h}}$	$\text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$ $\frac{\mu\text{Mol P}_i}{\text{mg Prot} \cdot \text{h}}$	Succinat-DH $\frac{\mu\text{Mol Succ.}}{\text{mg Prot} \cdot \text{h}}$
Bande 1	30 - 33 %	3	353 $\pm$ 74	1,42	11,7	15,5	-
Bande 2	33 - 36 %	3	494 $\pm$ 63	1,29	8,0	18,3	7,7
Bande 3	36 - 38 %	3	557 $\pm$ 114	0,36	2,6	11,4	15,6
Bande 4	38 - 42 %	3	548 $\pm$ 237	0,50	-	4,6	14,4
Homogenat		3	25199 $\pm$ 3517	0,11	1,2	3,1	1,6

5'-Nucleot. = 5'-Nucleotidase
Succinat-DH = Succinat-Dehydrogenase

Zur Charakterisierung der Reinheit der verschiedenen im Saccharose-Gradienten gewonnenen Fraktionen wurden als Marker-Enzyme die Aktivitäten der in der Plasmamembran lokalisierten 5'-Nucleotidase und der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase, sowie die Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase bestimmt.

In der Membranfraktion (Bande 1 = 30 - 33 %) war die Aktivität der 5'-Nucleotidase gegenüber dem Gesamthomogenat um den Faktor 13 angereichert (Tab. 11). Die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase war bei der Membranfraktion um den Faktor 9,8 erhöht; Succinat-Dehydrogenase war in der Membranfraktion nicht nachweisbar. Die Banden 3 und 4 (Mitochondrien) wiesen gegenüber dem Gesamthomogenat eine Erhöhung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität um den Faktor 9,8 bzw. 9,0 auf. Bande 2 (33 - 36 %), die aus Membranvesikeln und Mitochondrien-Bruchstücken (Abb. 17 B) bestand, zeigte ebenfalls eine Erhöhung der 5'-Nucleotidase und der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase. Die Anreicherung dieser Enzyme lag jedoch unter den Werten der Bande 1; außerdem war eine Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase meßbar. Bande 2 zeigte die höchste Anreicherung der Mg^{++} -ATPase (6 fach).

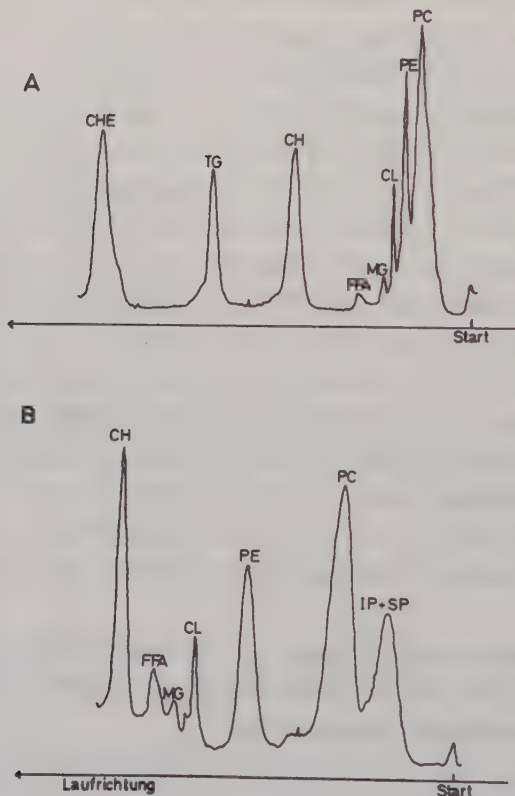
Die elektronenmikroskopischen Bilder und die biochemischen Reinheitskriterien zeigten, daß die Membranfraktion (Bande 1 : 30 - 33 %) einen hohen Reinheitsgrad aufweist.

3.6. Lipidanalysen

3.6.1. Bestimmung des Lipidverteilungsmusters der ED-0,15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen, und der Plasmamembranen der ED-0,15-, EG-65-, ED-in vivo- und ED-0,35-Zellen.

Die zellulären Gesamtlipide der ED-0,15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen und die aus den Plasmamembranen der ED-0,15-, EG-65,

Abb. 18 : Densitometrische Bestimmung der dünnenschichtchromatographisch getrennten Hauptlipidklassen von ED-in vivo-Zellen.



Abkürzungen:

CHE: Cholesterinester

TG : Triglyceride

CH : Cholesterin

FFA: freie Fettsäuren

IP + SP : Inositolphosphatid + Sphingomyelin

MG: Monoglyceride

CL: Cardiolipin

PE: Phosphatidyläthanolamin

PC: Phosphatidylcholin

Als Laufmittel wurden verwendet:

A : 1. Lauf : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{Eisessig}$ (65 : 28 : 9; v/v/v)

2. Lauf : CHCl_3

B : 1. Lauf : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{Eisessig}$ (65 : 28 : 9; v/v/v)

2. Lauf : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (75 : 25 : 4; v/v/v)

3. Lauf : CHCl_3

Tab. 12: Hauptlipidklassen^x von ED-0, 15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen, und von Plasmamembranen aus ED-0, 15-, EG-65-, ED-in vivo und ED-0, 35-Zellen

	Gesamtzellen			Plasma-Membranen		
	ED-0, 15	EG-65	ED-in vivo	ED-0, 15	EG-65	ED-in vivo ED-0, 35
μg Lipid/mg Protein	197,0 $\pm$ 3,0	338,7 $\pm$ 36,4	345,0 $\pm$ 8,1	2196,9 $\pm$ 258,3	2883,1	1364,3
Cholesterinester	12,5 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 2,5	12,9 $\pm$ 4,0	—	—	—
Triglyceride	7,6 $\pm$ 0,3	20,3 $\pm$ 3,7	12,6 $\pm$ 0,4	—	—	—
Cholesterin	9,5 $\pm$ 0,3	9,1 $\pm$ 2,1	10,1 $\pm$ 0,2	23,1 $\pm$	2,9 35,6	21,7 41,2
freie Fettsäuren	4,1 $\pm$ 0,5	4,9 $\pm$ 2,2	1,7 $\pm$ 0,2	10,2 $\pm$	1,5 13,8	7,6 18,1
Monoglyceride	1,4 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,4	—	—	—	—
Cardiolipin	4,6 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$	0,9 —	—
Phosphatidyläthanolanin	16,3 $\pm$ 3,3	7,2 $\pm$ 0,8	15,1 $\pm$ 2,5	20,2 $\pm$	2,8 6,8	26,0 14,0
Phosphatidylcholin	33,8 $\pm$ 1,8	35,6 $\pm$ 1,9	30,4 $\pm$ 0,3	27,0 $\pm$	2,6 22,1	18,6 23,5
Sphingomyelin + Inositolphosphatide	10,2 $\pm$ 6,5	10,1 $\pm$ 2,1	11,9 $\pm$ 2,4	18,4 $\pm$	0,1 21,7	26,1 3,3
Phospholipide, total	64,9	57,6	62,5	66,5 $\pm$	4,5 50,6	70,6 40,8

^xAngaben: in %, bezogen auf Gesamtlipid (μg Lipid/ mg Protein).

ED-in vivo- und ED-0,35-Zellen isolierten Lipide wurden dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt und densitometrisch bestimmt. Ein typisches Densitogramm zeigt Abb. 18 A, B. Die Auswertung der Densitogramme ist in Tab. 12 aufgezeigt.

Der Gesamtlipidgehalt von ED-in vivo-Zellen und EG-65-Zellen unterschied sich nicht wesentlich voneinander; gegenüber ED-0,15-Zellen war er jedoch um 40 % erhöht (Tab. 12).

EG-65-Zellen unterschieden sich von ED-0,15-Zellen in der prozentualen Lipidzusammensetzung signifikant in dem Gehalt von Cholesterinester (50 % erniedrigt), Triglyceriden (63 % erhöht) und Phosphatidyläthanolamin (56 % erniedrigt); der Phospholipidgehalt war geringfügig erniedrigt.

ED-in vivo-Zellen unterschieden sich signifikant von ED-0,15-Zellen außer im Gesamtlipidgehalt auch in dem Gehalt an freien Fettsäuren (40 % erniedrigt).

3. 6. 1. 1. Bestimmung der Hauptklassen der Membranlipide aus Plasmamembranen von ED-0,15-, EG-65-, ED-in vivo- und ED-0,35-Zellen.

Die Lipidzusammensetzung der Membranfraktionen unterschied sich von der Lipidzusammensetzung der Gesamtzellen wesentlich. Cholesterinester, Triglyceride und Monoglyceride waren in den Membranfraktionen nicht enthalten (Tab. 12). Cardiolipin, ein Lipid der Mitochondrienmembran war nur in einer Fraktion mit <1 % enthalten, dies sprach für die Reinheit der Membranfraktionen.

Der Gesamtlipidgehalt, bezogen auf das Membranprotein, war bei EG-65-Zellen , verglichen mit ED-0,15-Zellen um 24 % erhöht; erhöht war ebenfalls der Gehalt an Cholesterin (35 %); erniedrigt der Gehalt an Phosphatidyläthanolamin (66 %).

ED-in vivo-Zellen enthalten, verglichen mit den Plasmamembranen von ED0,15-Zellen, 78 % weniger Gesamtlipid. Die Lipidzusammen-

setzung unterschied sich vor allem bei den Phospholipiden : Phosphatidyläthanolamin und Sphingomyelin + Inositolphosphatid waren erhöht (22,3 % bzw. 30 %) und Phosphatidylcholin (Lecithin) war im Gehalt erniedrigt.

Der Gesamtlipidgehalt der Plasmamembranen von ED-0,35-Zellen^x (bezogen auf Membranprotein) war gegenüber ED-0,15-Zellen erniedrigt (um 38 %). Hinsichtlich der Lipidzusammensetzung unterschieden sich ED-0,35-Zellen von ED-0,15-Zellen durch einen um etwa 50 % erhöhten Cholesteringehalt und einen um 40 % erniedrigten Gesamtpospholipidgehalt, wobei insbesondere Phosphatidyläthanolamin um 30 % erniedrigt war.

Bezüglich der Lipidzusammensetzung der isolierten Plasmamembranen war der -im Vergleich mit ED-0,15- Plasmamembranen- relativ erniedrigte Gesamtpospholipidgehalt von EG-65-Plasmamembranen und ED-0,35-Plasmamembranen auffällig, wobei bei den EG-65-Plasmamembranen insbesondere der Phosphatidyläthanolamin-Gehalt und bei den ED-0,35-Plasmamembranen der Gehalt an Sphingomyelin + Inositolphosphatiden vermindert war (Tab. 12). Insgesamt lag der auffälligste Unterschied hinsichtlich der Lipidzusammensetzung der Plasmamembranen von in hypertonem Medium wachsenden ED-0,35-Zellen und EG-65-Zellen- im Vergleich mit den Plasmamembranen, der in isotonem Medium wachsenden ED-0,15-Zellen - in dem relativ verminderten Gehalt an Phospholipiden und dem relativ erhöhten Gehalt an Cholesterin.

^xDie Gesamtlipide und die Lipidklassen von ED-0,35-Zellen waren in früheren Untersuchungen bereits bestimmt worden (SCHACHTSCHABEL, EGGE; 1971; SCHACHTSCHABEL, EGGE, ZILLIKEN; 1972; LEISS, 1974). Die genannten früheren Bestimmungen waren nicht an Plasmamembranen durchgeführt worden.

3.6.2. Verteilung der Fettsäuren in den Gesamtlipiden von ED-0,15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen.

Die gaschromatographische Analyse der Fettsäuren - nach Hydrolyse der Gesamtlipide von ED-0,15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen - ergab, daß Fettsäuren mit 18 C-Atomen wie Stearinsäure (18 : 0), Ölsäure (18:1) und Linolsäure (18:2, ω 6) den überwiegenden Teil der in den Gesamtlipiden vorkommenden Fettsäuren darstellen (Tab. 13). Die Gesamtlipide von ED-0,15-Zellen enthielten 47 % C_{18} -Fettsäuren (Tab. 13), davon waren 24 % Stearinsäure (18:0), 17 % Ölsäure (18:1, ω 9), 4 % Linolsäure (18:2, ω 6) und etwa 1 % dreifach ungesättigte C_{18} -Fettsäuren. 36 % der Fettsäuren von ED-0,15-Zellen waren längerkettig (C_{20} , C_{22} , C_{24}), wobei diese Fettsäuren ein bis mehrfach (6-fach) ungesättigt vorlagen. Den überwiegenden Teil der längerkettigen Fettsäuren stellten folgende C_{20} -Körper dar : 20:3, ω 9 = 10 %; 20:4, ω 6 = 7 %; 20:5, ω 3 = 4 %. Fettsäuren der Kettenlängen C_{14} bis C_{17} waren in ED-0,15-Zellen zu 15 % enthalten, wobei Palmitinsäure (16:0) mit 9 % den größten Anteil dieser Fettsäuren bildete.

Die Gesamtlipide von EG-65-Zellen enthielten 49 % C_{20} - C_{22} - C_{24} -Fettsäuren, 37 % C_{18} -Fettsäuren und 14 % C_{14} - bis C_{17} -Fettsäuren. Verglichen mit ED-0,15-Zellen waren die längerkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (C_{20} , C_{22} , C_{24}) bei EG-65-Zellen vermehrt vorhanden (Tab. 13).

Die Gesamtlipide von ED-in vivo-Zellen enthielten 51 % C_{18} -Fettsäuren, 34 % C_{20} - C_{22} - C_{24} -Fettsäuren und 15 % C_{14} - bis C_{17} -Fettsäuren. Verglichen mit ED-0,15-Zellen war bei ED-in vivo-Zellen eine signifikante Erhöhung des Gehaltes an Linolsäure (18:2, ω 6) und eine Verminderung des Gehaltes an Stearinsäure (18:0) vorhanden (Tab. 13).

Tab. 13 : Prozentuale Verteilung der Fettsäuren nach saurer Methanolyse des Gesamtlipids von ED-0,15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen (Resultate: arithmetisches Mittel der Ergebnisse von 2 Proben).

Nr. Fettsäure	ED-0,15	EG-65	ED-in vivo
1 i 14	0,3 ± 0,06	0,31 ± 0,26	0,3 ± 0,1
2 14:0	0,6 ± 0,15	0,22 ± 0,05	0,5 ± 0,14
3 14:1	—	—	—
4 15:0	0,16 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,07 ± 0,005
5 15:1	0,75 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,46 ± 0,17
6 i 16	0,51 ± 0,06	0,19 ± 0,06	0,46 ± 0,17
7 16:0	8,8 ± 0,8	9,0 ± 0,2	10,4 ± 0,1
8 16:1 ω 7	2,9 ± 0,04	2,5 ± 0,5	1,9 ± 0,43
9 17:0	0,23 ± 0,04	0,3 ± 0,05	0,18 ± 0,02
10 17:1 ω 8	0,59 ± 0,09	0,63 ± 0,14	0,45 ± 0,08
11 i 18	0,43 ± 0,21	0,31 ± 0,06	0,23 ± 0,03
12 18:0	24,1 ± 5,0	16,7 ± 1,6	17,7 ± 2,8
13 18:1 ω 9	17,2 ± 1,8	14,6 ± 0,8	17,7 ± 1,6
14 18:2 ω 6	3,9 ± 0,6	4,6 ± 0,07	15,1 ± 0,6
15 18:3 ω 6	0,6 ± 0,2	0,53 ± 0,03	0,34 ± 0,04
16 18:3 ω 3	0,6 ± 0,2	0,61 ± 0,04	0,49 ± 0,07
17 20:1 ω 9	1,3 ± 0,6	3,02 ± 1,4	3,0 ± 0,09
18 20:2 ω 6	1,4 ± 0,5	1,08 ± 0,04	3,0 ± 0,09
19 20:3 ω 9	9,5 ± 5,8	1,5 ± 1,0	1,75 ± 0,03
20 20:3 ω 6	2,18 ± 0,08	6,68 ± 1,0	2,8 ± 0,08
21 20:4 ω 6	7,0 ± 1,2	5,9 ± 1,8	8,7 ± 0,8
22 22:1 ω 9	0,73 ± 0,2	0,8 ± 0,7	0,56 ± 0,06
23 22:2 ω 6	1,9 ± 0,6	7,15 ± 1,0	1,2 ± 0,07
24 20:5 ω 3	3,9 ± 0,5	1,6 ± 1,5	2,4 ± 1,0
25 22:4 ω 6	1,3 ± 0,5	7,2 ± 2,0	0,34 ± 0,2
26 24:1 ω 9	0,2 ± 0,8	0,85 ± 0,36	1,4 ± 0,4
27 22:5 ω 6	—	2,6 ± 2,6	0,18 ± 0,05
28 22:5 ω 3	3,4 ± 0,4	2,98 ± 0,2	2,0 ± 0,5
29 22:6 ω 3	3,4 ± 0,2	7,3 ± 5,2	8,7 ± 3,7

3.6.2.1. Verteilung der Fettsäuren der Plasmamembranlipide von ED-0,15-, ED-in vivo-, EG-65- und ED-0,35-Zellen.

Die Fettsäureverteilung der Membranlipide zeigt Tab. 14. Die Lipide der Plasmamembranen von ED-0,15-Zellen enthielten 98 % C_{18} -Fettsäuren, dabei waren 53 % der C_{18} -Körper gesättigt (Stearinsäure, 18:0), 45 % einfach ungesättigt (Ölsäure, 18:1) und weniger als 1 % zwei- oder mehrfach ungesättigt; längerkettige Fettsäuren (C_{20} , C_{22} , C_{24}) waren kaum vorhanden (< 1 %).

Die Lipide der Plasmamembranen von EG-65-Zellen enthielten 87 % C_{18} -Fettsäuren, dabei betrug der Anteil an Stearinsäure (18:0) 79 %, an Ölsäure (18:1) 6 % und 2 % waren zweifach ungesättigt (Linolsäure, 18:2, ω 6). Das Gesamtlipid der EG-65-Plasmamembranen enthielt 9 % längerkettige C_{20} - C_{22} - C_{24} -Körper, während in ED-0,15-Zellmembranen weniger als 1 % vorhanden waren. Diese längerkettigen Fettsäuren von EG-65-Zellmembranen waren meist zwei- oder mehrfach ungesättigt.

Die ED-in vivo-Zellen enthielten in dem Gesamtlipid der Plasmamembranen 70 % C_{18} -Fettsäuren, davon waren 60 % Stearinsäure (18:0), 17 % Ölsäure (18:1) und < 4 % Linolsäure (18:2, ω 6); außerdem enthielten die Lipidfraktionen 16 % längerkettige Fettsäuren (C_{20} , C_{22} , C_{24}). Sie enthielten somit mehr längerkettige, ungesättigte Fettsäuren als die Plasmamembranen der anderen untersuchten Zellarten (Tab. 14).

Die Plasmamembranen von ED-0,35-Zellen enthielten in ihrem Gesamtlipid 86 % C_{18} -Fettsäuren, davon waren 64 % Stearinsäure (18:0), 18 % Ölsäure (18:1) und ca. 3 % Linolsäure (18:2, ω 6). Längerkettige, ungesättigte Fettsäuren (C_{20} , C_{22} , C_{24}) waren zu 13 % enthalten.

Tab. 14 :Prozentuale Verteilung der Fettsäuren nach saurer Methanolyse des Gesamtlipids der Plasmamembranen von ED-0,15-, EG-65-, ED-in vivo- und ED-0,35-Zellen.

Nr. Fettsäure	ED-0,15	EG-65	ED-in vivo	ED-0,35
1 i 14	—	—	0,05	—
2 14:0	0,03	1,13	1,03	0,45
3 14:1	0,03	0,14	0,18	0,28
4 15:0	0,01	0,14	0,13	0,13
5 15:1	0,01	0,02	0,02	0,1
6 i 16		0,02	0,06	0,08
7 16:0	0,22	1,87	2,0	1,91
8 16:1 ω 7	0,02	0,26	0,07	0,46
9 17:0	0,01	0,07	0,14	0,14
10 17:1 ω 8	0,004	0,05	0,07	0,13
11 i 18	0,02	0,05	0,06	0,08
12 18:0	53,23	79,4	59,54	63,79
13 18:1 ω 9	44,56	6,0	16,6	18,27
14 18:2 ω 6	0,56	2,04	3,63	2,86
15 18:3 ω 6	0,13	0,11	0,38	0,56
16 18:3 ω 3	0,07	0,13	0,13	0,57
17 20:1 ω 9	0,08	0,17	0,29	0,36
18 20:2 ω 6	0,03	0,17	0,12	0,45
19 20:3 ω 9	0,06	0,12	0,22	0,1
20 20:3 ω 6	0,07	0,74	0,92	0,6
21 20:4 ω 6	0,23	1,98	2,8	2,44
22 22:1 ω 9	—	—	—	—
23 22:2 ω 6	—	1,08	1,37	0,75
24 20:5 ω 3	0,12	0,27	1,21	0,75
25 22:4 ω 6	0,09	1,33	2,07	0,52
26 24:1 ω 9	—	0,68	0,3	0,28
27 22:5 ω 6	0,21	0,18	—	0,38
28 22:5 ω 3	—	0,31	2,92	1,05
29 22:6 ω 3	0,32	1,57	2,88	3,31

4. Diskussion

Frühere Untersuchungen (SCHACHTSCHABEL und EGGE, 1971; KÜRSCHNER, 1971; EGGE und MITARB., 1972; SCHACHTSCHABEL und MITARB., 1972; SCHACHTSCHABEL, 1972; SCHACHTSCHABEL und MITARB., 1974; KOHEN und MITARB., 1974; SCHACHTSCHABEL und KÜRSCHNER, 1972) haben gezeigt, daß Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, deren Wachstum an hypertone Medien adaptiert war, eine erhöhte ATPase-Aktivität, eine längere Verdopplungszeit, höheren Proteingehalt, höhere Laktatproduktion, erhöhten O_2 -Verbrauch, sowie einen veränderten Lipidstoffwechsel zeigten. Diese Resultate wurden im Sinne einer Stimulierung des zellulären Energiestoffwechsels und unter dem Aspekt veränderter Membraneigenschaften gedeutet.

Es erhob sich die Frage, ob diese gemessenen Veränderungen als Ausdruck einer zellulären Antwort auf das hypertone Milieu oder spezifisch auf das veränderte Ionenmilieu zu deuten sind. Aus diesen und anderen Überlegungen sollte im Rahmen dieser Arbeit insbesondere untersucht werden, welche Veränderungen im Wachstum und Stoffwechsel in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen durch den Einfluß kurzzeitig (Stunden oder Tage) oder langfristig (Monate bzw. Jahre) erhöhter Glucose- oder Ionen-Konzentration im Kulturmedium auftreten. Bezüglich des Kurzzeit-Einflusses (mehrere Tage) von exogener Glucose auf das Wachstum von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Kultur, zeigte sich, daß Glucose-Zusatz zum Medium in Konzentrationen von 50 bzw. 65 mg/ml eine Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit um etwa 50 % (Abb. 3) und eine Glucose-Konzentration von 100 mg/ml eine vollständige Inhibition bewirkte. Eine Wachstumshemmung bzw. toxischer Einfluß ("Glucose-Toxizität") durch exogene Glucose wurde von mehreren Autoren an verschiedenen in-vitro-Systemen beobachtet (JONES und BONTING, 1956). So

fanden ZWARTOUW und WESTWOOD (1958), GRAFF und MITARB. (1965), BAUGH und MITARB. (1967), BAILEY und MITARB. (1969) und MORGAN und ENG (1970) eine irreversible Wachstumshemmung durch Glucose.

Andererseits gelang es in unserem Labor, Zellkulturen mit einem Glucose-Gehalt im Kulturmedium von 50, 65 und 75 mg/ml in Langzeit-Monolayer-Kulturen zu züchten (SCHACHTSCHABEL und MITARB., unveröff. Resultate). Sogar in Gegenwart von 100 mg/ml Glucose konnten Ehrlich-Ascites-Tumorzellen mindestens 14 Tage in Kultur gezüchtet werden. Damit stellte sich das Problem, welche Mechanismen die Zelle befähigen, in Gegenwart dieses hypertonen Glucose-Milieus zu wachsen. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob Membranveränderungen oder Veränderungen im Energiestoffwechsel (verstärkter "Crabtree-Effekt") eingetreten waren.

Bevor die Befunde über "Glucose-adaptierte" Zellen in dieser Arbeit diskutiert werden, sollen zunächst die Befunde über den Kurzzeiteinfluß eines veränderten Zucker- und Salz-Milieus, insbesondere auf die Atmung, besprochen werden.

Einfluß verschiedener Medien (mit unterschiedlichem Salz- und Zucker-Gehalt) auf den zellulären O_2 -Verbrauch

O_2 -Verbrauch in Eagles Basalmédium und Earles Salzlösung

Für die Züchtung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen wurde Eagles Basalmédium (BME) verwendet, dem fötales Kalbsserum zugesetzt war. Eagles Basalmédium (Tab. 1) enthält neben Vitaminen und Salzen (Earles Salzen) Nährstoffe, wie Aminosäuren und Glucose. Aminosäuren, insbesondere Glutamin, können - neben Glucose - als Atmungssubstrate von der Zelle verwendet werden (DICKENS und GREVILLE, 1933; DICKENS, 1946; MC ILWAIN, 1946; KOVACEVIC und MORRIS, 1972; RAPOPORT und MITARB., 1957; KRAUSE, 1973). Es wurde der O_2 -Verbrauch von ED-0,15-Zellen und

ED-in vivo-Zellen, suspendiert in Eagles Basalmedium (Glucose: 1 mg/ml) oder Earles Salzlösung (Glucose: 1 mg/ml), gemessen und miteinander verglichen (Tab. 9). Es zeigte sich, daß der O_2 -Verbrauch in Eagles Basalmedium etwas (um 6 - 7 %) höher war. Welche Komponenten des Mediums diese leichte Erhöhung bewirkten, wurde nicht untersucht. So könnte z. B. Glutamin, das den O_2 -Verbrauch von Zellen stimulieren kann (DICKENS, 1946; MC ILWAIN; 1946), für diesen Effekt verantwortlich sein.

O_2 -Verbrauch in verschiedenen Salzlösungen

Es gibt eine Reihe von Befunden in der Literatur (Übersicht: PAUL, 1965; WHITFIELD und MITARB., 1968; YOUNG und MORTON, 1970; SCHACHTSCHABEL und FOLEY, 1972; SCHACHTSCHABEL, 1972), daß Nährmedien mit verändertem Ionen- oder Nicht-Elektrolyt-Gehalt Effekte auf Wachstum und Energiestoffwechsel ausüben können. Jedoch gibt es keine vergleichende Untersuchung hinsichtlich des Einflusses verschiedener physiologischer Salzlösungen auf den Atmungsstoffwechsel.

Tumorzellen weisen eine relativ hohe endogene Atmung (WARBURG, 1926 a, b, 1930) auf; sie sind in der Lage, über einen gewissen Zeitraum ohne Zufuhr von exogenen Nährstoffen die Atmung aufrechtzuerhalten (durch Utilisation intrazellulärer Substrate, wie z. B. Lipide). Der Einfluß unterschiedlicher physiologischer Salzlösungen (Tab. 2) auf den O_2 -Verbrauch von ED-in vivo-Zellen zeigte, daß relevante Unterschiede zwischen physiologischen Salzlösungen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die endogene Atmung nicht bestehen. (Tab. 7). Die verwendeten Salzlösungen waren folgende: Earles Salz- (EARLE, 1943), Locke-, Tyrode-, Ringer A- (aus: RO-MEIS, 1948), Ringer B- (CRABTREE, 1929) und Tris-Puffer (pH 7,4; 0,1 M)-Lösungen. Die Messungen wurden über einen Zeitraum von etwa 30 Min durchgeführt.

O₂-Verbrauch in verschiedenen Zuckerlösungen

Es ist bekannt, daß exogene Glucose im Nährmedium eine Hemmung der Atmung bewirkt (CRABTREE, 1929; Crabtree-Effekt). Neben Glucose bewirken auch diejenigen Kohlenhydrate eine Hemmung der Atmung, die von der Zelle metabolisiert werden (IBSEN, 1971). Durch die vorliegenden eigenen Ergebnisse (Abb. 5, 8; Tab. 8) konnte dieser Befund anderer Autoren bestätigt werden.

Wurde der Einfluß verschiedener Zucker auf den O₂-Verbrauch von ED-in vivo-Zellen gemessen, so zeigte sich, daß die Monosaccharide Glucose, Mannose und Fructose einen Crabtree-Effekt bewirken, mit einer Inhibition der Atmung von 20 - 30 %. Saccharose, von der bekannt ist, daß sie nicht metabolisiert wird (MORGAN und MORTON, 1960; HENDIL und HOFFMANN, 1974), bewirkte keine Hemmung der Atmung; der Sauerstoffverbrauch wurde im Gegenteil durch Saccharose stimuliert (Abb. 5, 8; Tab. 8). Eine hohe Stimulierung des O₂-Verbrauchs um 70 % trat auf bei einer Inkubationszeit von 15 Min in hypertonen Saccharose-Lösung (Abb. 6 A). Über den Einfluß von Saccharose auf die endogene Atmung ist aus der Literatur nur wenig bekannt. So fanden HENDIL und HOFFMANN (1974) durch Behandlung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen mit hypotonem Milieu und anschließendem Angleichen der Tonizität durch Saccharose auf eine isotone Konzentration, daß K⁺-Ionen durch den Einfluß des Saccharose-Mediums angereichert wurden. Möglicherweise ist der beschriebene Effekt, nämlich die Erhöhung der intrazellulären K⁺-Konzentration die Ursache für die gesteigerte Atmung durch Saccharose. Über eine Stimulierung der Atmung durch K⁺-Ionen berichteten LEVINSON und HEMPLING (1967). Indirekt wäre eine Stimulierung der Atmung durch K⁺-Ionen möglich, in dem sie Calciumionen, die z. B. die Pyruvatkinase (ein Schlüsselenzym der Glykolyse) hemmen, kompetitiv verdrängen (BYGRAVE, 1966). Jedoch konnten HENDIL und HOFFMANN

(1974) bei Veränderungen der Tonizität des Inkubationsmediums keine Veränderungen der intrazellulären Ca^{++} -Ionen-Konzentration feststellen.

Der Einfluß hypertoner Saccharose-Lösung auf den O_2 -Verbrauch von ED-0,15-Zellen wurde nach einer Inkubationszeit von 15 Min und nach 1,5 Std bestimmt. Dabei zeigte sich, daß der O_2 -Verbrauch nach einer Inkubationszeit von 15 Min und einem Saccharose-Gehalt von 70 - 100 mg/ml um etwa 70 % gesteigert war (Abb. 6 A), eine Schädigung der Zellen (Trypanblaufärbung) trat auch bei Saccharose-Konzentrationen von 100 bzw. 200 mg/ml nach 15 Min nicht auf. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Std war eine Stimulierung des O_2 -Verbrauchs nicht mehr vorhanden. In Gegenwart von 200 mg/ml Saccharose war der O_2 -Verbrauch nach 1,5 Std um 60 % vermindert. Da jedoch unter diesen Bedingungen nahezu alle Zellen trypanblau-gefärbt waren, wird vermutet, daß längere Einwirkung von Saccharose zu zellulären "Schäden" führt.

Trypanblaufärbung als Kriterium der Vitalität

Bei Messungen des Sauerstoffverbrauchs von ED-0,15-Zellen und ED-in vivo-Zellen zeigte sich, daß eine geringe Atmung selbst dann noch nachweisbar war, nachdem alle Zellen trypanblau-gefärbt waren (Abb. 6 B, 7). EATON (1959) fand zwar, daß eine Trypanblaufärbung der Zellen den Zelltod anzeigt, und daß eine endogene Atmung folglich nicht zu erwarten ist. Der in den vorliegenden Versuchen gemessene Sauerstoffverbrauch trotz totaler Trypanblaufärbung kann als rudimentärer O_2 -Verbrauch von Mitochondrien oder Mitochondrien-Bruchstücken (Elektronen-Transportierende Partikel) gedeutet werden. Wie aus den Abbildungen 6 A, B; 7; 10; 11 ersichtlich ist, korreliert bei Zellschädigung die Abnahme des O_2 -Verbrauchs jedoch grundsätzlich mit der Zunahme an trypanblau-gefärbten Zellen.

Charakterisierung der "Glucose-adaptierten" Zellen

Wachstumsparameter

Bei der Bestimmung von Wachstumsparametern wie Protein-, DNA-, und RNA-Gehalt zeigte sich, daß Glucose-Zusatz zum Medium in höheren Konzentrationen von 50 bzw. 65 mg/ml eine Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit bewirkte: So war die Proteinzunahme durch 50 mg/ml Glucose im Kulturmedium um 50 % verlangsamt (Abb. 4). Nach Adaptation des Wachstums von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen an eine Glucose-Konzentration von 50 mg/ml (EG-50-Zellen) war die Wachstumsgeschwindigkeit gemessen an der Proteinzunahme/Kultur (Abb. 4) im Vergleich zu ED-0,15-Zellen um 50 % erniedrigt. Es zeigte sich dabei, daß vor allem die Proliferationsgeschwindigkeit erniedrigt war, der Proteingehalt von EG-50-Zellen war gegenüber ED-0,15-Zellen verdoppelt. Unverändert waren bei EG-50-Zellen die Gehalte von DNA (Protein/DNA) und RNA (Protein/ RNA).

Energiestoffwechsel

Untersuchungen über den Energiestoffwechsel (Atmung und Glykolyse) ergaben, daß "Glucose-adaptierte" Zellen (EG-50-Zellen) einen Mehr-Verbrauch an Sauerstoff aufwiesen, im Vergleich mit Zellen, die in isotonem Medium gewachsen waren (ED-0,15-Zellen). Der erhöhte O_2 -Verbrauch zeigte sich insbesondere bei EG-50-Zellen (21 % Erhöhung, bezogen auf das Gesamtprotein der Zelle) im Vergleich zu ED-0,15-Zellen.

Bei Bestimmungen der Laktatproduktion im Nährmedium von ED-0,15-Zellen und EG-50-Zellen konnte eine Erhöhung der Laktatproduktion von EG-50-Zellen um 45 % gemessen werden (Tab. 6). Die effektive Laktatproduktion pro Zeiteinheit war hingegen, unter Berücksichtigung des verlangsamtten Zellwachstums bei EG-50-Zellen (Abb. 4), nicht erhöht.

Insgesamt kann der Energiestoffwechsel von EG-50-Zellen somit als leicht erhöht angesehen werden. Der erhöhte Sauerstoffverbrauch bei EG-50-Zellen bewirkte eine Mehr-Synthese von 852 nMol ATP/mg Protein x h, wenn eine gute Kopplung der oxidativen Atmungskettenphosphorylierung an den Elektronentransport der Atmungskette vorausgesetzt wird. Bemerkenswert an diesem Befund bleibt, daß diese erhöhte Produktion an ATP wegen des verlangsamten Wachstums eigentlich nicht zu erwarten war. Im Laufe der weiteren Diskussion wird dieser Aspekt noch einmal aufgegriffen.

Da "Glucose-adaptierte" Zellen einen höheren O_2 -Verbrauch zeigten, wurde untersucht, ob Glucose auch in höheren Konzentrationen (50 und 100 mg/ml) eine Stimulierung der Atmung bewirkt (Abb. 9), und ob Glucose-Zusatz zum Medium von ED-0,15-, ED-in vivo- und EG-50-Zellen diese Zellen hinsichtlich ihres O_2 -Verbrauchs unterschiedlich beeinflusst. Dies konnte nicht nachgewiesen werden; Über den weiten Konzentrationsbereich von 1 - 100 mg/ml Glucose war der zelluläre O_2 -Verbrauch der jeweiligen Zellart praktisch gleich. Es wurde kein signifikant stimulierender Effekt von höheren Glucose-Konzentrationen auf den O_2 -Verbrauch gefunden (Abb. 9).

Es konnte im übrigen nicht nachgewiesen werden, daß EG-50-Zellen in Gegenwart von Glucose einen Crabtree-Effekt aufweisen. Erstaunlich ist, daß EG-50-Zellen, die sich in ihrem Wachstum an 50 mg/ml Glucose im Nährmedium angepaßt hatten, bei einer Glucose-Konzentration von 1 mg/ml keine Veränderung in ihrem O_2 -Verbrauch zeigten, obwohl die Erniedrigung im Glucose-Gehalt des Mediums eine erhebliche Abnahme der Tonizität bedeutet.

Alle untersuchten Zellen tolerierten eine veränderte Tonizität des extrazellulären Mediums, ohne eine Veränderung im O_2 -Verbrauch zu zeigen.

Änderungen der Enzymaktivitäten

Es wurden vergleichende Messungen der Aktivitäten verschiedener Enzyme der Glykolyse, des Pentosephosphatzyklus, des Aminosäurestoffwechsels und des Citratzyklus von ED-0,15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen durchgeführt, um aus möglichen Veränderungen des Enzymmusters Rückschlüsse auf Veränderungen insbesondere des Glucose-Stoffwechsels zu schließen.

Im Vergleich zu ED-0,15-Zellen konnten bei EG-65-Zellen keine Veränderungen in den Aktivitäten glykolytischer Enzyme wie Hexokinase, Phosphofructokinase, Aldolase, Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase festgestellt werden (Abb. 13). Ebenfalls unverändert waren bei EG-65-Zellen die Enzyme des Citratzyklus (Malat - Dehydrogenase) und solche Enzyme, die über gemeinsame Substrate in direkter Beziehung zum Citratzyklus stehen, wie Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase. Im Vergleich mit ED-0,15-Zellen waren die NADP-abhängigen Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Gluconsäure-6-Phosphat-Dehydrogenase und Isocitrat-Dehydrogenase bei EG-65-Zellen signifikant erhöht.

Dies ist ein starker Hinweis, daß "Glucose-adaptierte" Zellen in erhöhtem Maße Glucose über den Pentosephosphatzyklus abbauen. KITOS und WAYMOUTH (1964) fanden, daß Mäuse-L-Zellen zu Beginn einer Inkubation mit Glucose bis zu 25 % Glucose über den Pentosephosphatzyklus metabolisieren. Schon nach kurzer Zeit jedoch wird der Glucoseabbau nach den Angaben dieser Autoren überwiegend über den Embden-Meyerhof- Abbau-Weg durchgeführt; nur ca. 1 % des Glucoseabbaues soll bei längerer Inkubation mit Glucose über den oxidativen Pentosephosphatzyklus (KITOS und WAYMOUTH, 1964) ablaufen. Die Enzymaktivitäten der Enzyme des Pentosephosphatzyklus bei EG-65-Zellen gegenüber ED-0,15-Zellen waren um 20 - 30 % erhöht. Die Bedeutung des Pentosephosphatzyklus für den

Gesamtstoffwechsel besteht im Bereitstellen von Pentosephosphat und NADPH_2 . NADPH_2 ist eine notwendige Komponente für die Versorgung von reduktiv verlaufenden Stoffwechselprozessen, insbesondere für die Synthese von Fettsäuren. Pentosephosphat ist andererseits ein essentieller Baustein von Nucleinsäuren. Da eine vermehrte Synthese von Nucleinsäuren in EG-65-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (Tab. 4), deutet die Erhöhung der Aktivitäten der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der Gluconsäure-6-Phosphat-Dehydrogenase auf eine vermehrte Lipidsynthese. Die im Vergleich mit ED-0,15-Zellen erhöhte Aktivität der cytoplasmatischen NADP-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase in EG-65-Zellen kann ebenso gedeutet werden.

Lipidveränderungen der Gesamtzellen

Auf Grund der enzymatischen Hinweise auf eine möglicherweise erhöhte Lipidsynthese bei "Glucose-adaptierten" Zellen wurden Lipidanalysen durchgeführt, wobei die Gesamtlipide und das Lipidspektrum sowie die Verteilung der Fettsäuren in den Gesamtlipiden von ED-0,15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen bestimmt wurden. Dabei stellte sich heraus, daß der Gesamtlipid-Gehalt der EG-65-Zellen um 40 % gegenüber dem Gesamtlipid-Gehalt der ED-0,15-Zellen erhöht war (Tab. 12). Die prozentuale Verteilung der Lipidklassen am Gesamtlipid-Gehalt (Tab. 12) zeigte, daß vor allem der Gehalt an Triglyceriden bei EG-65-Zellen, verglichen mit ED-0,15-Zellen, um etwa 60 % erhöht war. Erniedrigt hingegen waren bei "Glucose-adaptierten" Zellen der Gehalt an Cholesterinestern (um etwa 50 %) und an Phospholipiden (um etwa 10 %). Der Mindergehalt an Phospholipiden von EG-65-Zellen war dabei auf einen erniedrigten Gehalt an Phosphatidyläthanolamin zurückzuführen. Untersuchungen über das Fettsäurespektrum der Gesamtlipide von ED-0,15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen zeigte, daß Ehrlich-Ascites-Tumorzellen am häufigsten C_{18} -Fettsäuren enthielten (47 %,

51 %, 37 %). EG-65-Zellen enthielten, im Vergleich mit ED-0,15-Zellen, relativ mehr (49 % anstelle von 36 %) längerkettige, ungesättigte Fettsäuren (C_{20} , C_{22} , C_{24}). ED-in vivo-Zellen zeigten ein ähnliches Fettsäuremuster wie EG-65-Zellen; sie unterschieden sich von EG-65-Zellen im Gehalt an Linolsäure (18:2, ω 6, nahezu um den Faktor 4 erhöht) und an Stearinsäure (18:0, um nahezu 30 % erniedrigt).

Der beobachtete Anstieg des Gesamtlipids der EG-65-Zellen (Tab. 12), korreliert mit dem Anstieg der Aktivität der NADP-abhängigen Enzyme, so daß der Aktivitätsanstieg dieser Enzyme wohl als Ausdruck vermehrter Lipidsynthese interpretiert werden kann. In diesem Zusammenhang ist auch von Interesse, daß die in hypertonen Medien wachsenden "NaCl-adaptierten" Zellen einen erhöhten (EGGE und MITARB., 1972) Lipidgehalt mit einem Anstieg der zellulären Aktivitäten der Enzyme des Pentosephosphatzyklus aufwiesen. Insgesamt sind diese Veränderungen als Ausdruck einer erhöhten zellulären Glucose-Utilisation für den Pentosephosphatzyklus ($NADPH+H^+$ Bildung) für eine vermehrte Fettsäuresynthese zu verstehen. SPENCER und STEINBERG (1967) beschrieben, daß ein erhöhter zellulärer Lipidgehalt auf einen erhöhten Glucose-Gehalt im extrazellulären Milieu zurückgeführt werden kann.

Der erhöhte prozentuale Gehalt an längerkettigen, ungesättigten Fettsäuren am Gesamtlipid von EG-65-Zellen, im Vergleich mit ED-0,15-Zellen, geht einher mit einer Abnahme des Gehalts an Stearinsäure (18:0). Da Veränderungen des Fettsäurespektrums auch an den, aus ED-0,15- und EG-65-Zellen, isolierten Plasmamembranen festgestellt wurden (Abb. 14), deuten diese Unterschiede weniger auf Veränderungen des Fettsäurespektrums der Triglyceride, als auf möglicherweise selektive Unterschiede der Struktur (und Funktion ?) der Membranlipide hin.

Glycosaminoglycane

Es wurde ursprünglich vermutet, daß saure Glycosaminoglycane nur von Fibroblasten in vitro gebildet werden können (GROSSFIELD, 1961; HAMERMAN und MITARB. , 1965). Jedoch konnten SUZUKI und MITARB. (1970) auch an HeLa-S₃-Zellen, einer nicht fibroblastischen Zelllinie, die Synthese von sulfatierten Glycosaminoglycanen nachweisen.

Glycosaminoglycane können intrazellulär, perizellulär, d.h. mit der Zellmembran verbunden, oder extrazellulär bei in-vitro-Kulturen auftreten (NEUFELD und CANTZ, 1973). Glycosaminoglycane werden durch Sekretion als Makromoleküle in das Kulturmedium abgegeben. Sowohl extrazelluläre als auch ein Teil der perizellulären Glycosaminoglycane liegen als Proteoglycane vor (BUDDECKE, 1973).

Die biologische Bedeutung für die Sekretion extrazellulärer und die Ausbildung perizellulärer Glycosaminoglycane ist weitgehend unbekannt (FRATANTONI und MITARB. , 1968; NEUFELD und CANTZ, 1973). Es liegt jedoch die Vermutung nahe, daß solche perizellulären Glycosaminoglycane an den Permeabilitätseigenschaften von Plasmamembranen beteiligt sind (MICHL, 1971).

Eine Veränderung in der Zusammensetzung und der Syntheserate von Glycosaminoglycanen kann mögliche Hinweise auf eine veränderte Permeabilität der Plasmamembranen für Glucose oder NaCl bedeuten. Deshalb wurde die Synthese von Glycosaminoglycanen an ED-0, 15-, ED-0, 35-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen durch Einbau von ¹⁴C-Glucosamin verfolgt und der Einbau in Makromoleküle mit der elektrophoretischen Beweglichkeit von Glycosaminoglycanen nachgewiesen. Die Bestimmungen (Tab, 10) ergaben, daß ED-0, 15-Zellen die höchsten Einbauraten an ¹⁴C-Glucosamin aufwiesen. EG-65-Zellen zeigten hingegen nur 10 % der Einbauraten von ED-0, 15-Zellen, sowohl in den Zellen (intrazellulär und perizellu-

lär) als auch im Kulturmedium (extrazellulär); "NaCl-adaptierte", ED-0, 35-Zellen zeigten, im Vergleich mit ED-0, 15-Zellen, im Kulturmedium (extrazellulär) eine geringere Einbaurate an ^{14}C -Glucosamin, während der intrazelluläre Einbau etwa mit der gleichen Rate erfolgte.

Verglichen mit ED-0, 15-Zellen, zeigten ED-in vivo-Zellen etwa 75 % weniger ^{14}C -Glucosamin in den Glycosaminglycan-Fractionen. Die prozentuale Verteilung am Gesamteinbau ergab, daß EG-65-Zellen von allen untersuchten Zellen das meiste ^{14}C -Glucosamin in die Fraktion mit der elektrophoretischen Eigenschaften der sulfatierten Glycosaminglycane sowohl im extrazellulären als auch im intrazellulären Bereich einbaute.

ED-0, 35-Zellen, im Vergleich mit ED-0, 15-Zellen, enthielten mehr von einer Fraktion, die die elektrophoretische Beweglichkeit von nicht sulfatierten Glycosaminoglycanen aufweist, als alle anderen Zellen.

Hinsichtlich der Identifizierung und der chemischen Charakterisierung der Glycosaminoglycane bedarf es noch weiterer Untersuchungen, bevor über die Funktion dieser Substanzen Klarheit gewonnen werden kann. Der möglicherweise erhöhte Anteil an sulfatierten Glycosaminoglycanen in EG-65-Zellen könnte als Schutzmechanismus der Zelle gegenüber hypertonen Glucose-Konzentrationen gewertet werden. Es ist denkbar, daß vermehrt Glycosaminoglycane als Proteoglycane der Plasmamembran von EG-65-Zellen oder ED-0, 35-Zellen abgelagert sind, und dadurch Permeationseigenschaften dieser Zellen verändern und möglicherweise damit einen Schutz gegen das hypertone Milieu bewirken. Die relative Erhöhung des Gehalts an gewissen Glycosaminoglycanen (Tab. 10) bei EG-65-Zellen und ED-0, 35-Zellen erlaubt solche Vermutungen.

Weiterführende Untersuchungen über Glycosaminoglycane sind vor allem hinsichtlich der membrangebundenen perizellulären Proteoglycane notwendig. Auf Grund der Ladung polarer Sulfat- und Säure-

gruppen könnten Glycosaminoglycane ebenso wie Glycolipide (MORA und MITARB., 1969; HAKOMORI und MURAKAMI, 1968; BRADY und MITARB., 1969) zur negativen Ladung von Plasmamembranen beitragen. Ob auch ein Zusammenhang zwischen der erhöhten negativen Ladung der Membranen vieler Tumorzellen und der Glycosaminoglycansynthese besteht, kann nur vermutet werden.

Fragilitätsmessungen von ED-0, 15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen

Auf Änderungen der extrazellulären Tonizität reagieren Ehrlich-Ascites-Tumorzellen gleichsam als Osmometer. So schwellen sie zunächst in hypotoner Lösung und platzen nach einer gewissen Zeit. Der Zeitpunkt der Zellschädigung durch hypotones Medium wurde verwendet, um Aussagen über die Fragilität der Plasmamembranen von ED-0, 15-, EG-65- und ED-in vivo-Zellen zu gewinnen (Abb. 9, 10, 11). Diese Membranschädigung wurde mit der Methode der Trypanblaufärbung verfolgt, wobei die Anfärbung der Zellen als Indikator für eine Membrandurchlässigkeit und letztlich als Parameter des Zelltods angesehen wird (EATON, 1959). Da andererseits bekannt ist, daß die Trypanblaufärbung von Zellen mit der Abnahme der zellulären Atmung korrelieren soll (hypotone Schädigung der Mitochondrien), wurde auch der O_2 -Verbrauch bei diesen Versuchen zu Fragilitätsmessungen verwendet. Dabei ergab sich, daß EG-65- und ED-in vivo-Zellen ein ähnliches Verhalten gegenüber hypotoner Behandlung zeigten: beide Zellarten waren widerstandsfähiger als ED-0, 15-Zellen.

Da die hypotone Fragilität in Zusammenhang mit der Zusammensetzung der Plasmamembran der Zelle ("Starrheit") gesehen werden muß, ergibt sich die Überlegung, ob die Zusammensetzung des extrazellulären Milieus (in vitro-Nährmedium versus Ascitesflüssigkeit) letztlich eine Veränderung der Lipidzusammensetzung bewirkt. Hinweise auf eine veränderte Zusammensetzung der Plasmamembranen, die auf den Austausch zwischen exogenem (Nährmedium-) Li-

pid und Lipid der Zellmembran zurückzuführen ist, ist an Erythrozyten bekannt (DEUTICKE, 1972). Da EG-65- und ED-0,15-Zellen in vitro in Nährmedium mit gleicher Lipidzusammensetzung (fötales Kalbsserum) wachsen, können die Fragilitätsunterschiede zwischen diesen beiden Zellarten nur auf das Wachstum in hypotonem Glucose-Medium (EG-65-Zellen) zurückgeführt werden.

Membranisolierungen

Über Isolierungsmethoden von Plasmamembranen gibt es umfangreiche Literatur (Übersicht: DE PIERRE und KARNOVSKI, 1973). Eine kritische Betrachtung über Plasmamembranfraktionen beschrieben WALLACH und LIN (1973). Die Isolierung von Plasmamembranen aus Ascites-Tumorzellen beschrieben WALLACH und ULLREY (1962), SCHÖN und MENKE (1967), MOLNAR und MITARB. (1969), COLOMBINI und JOHNSTONE (1973) und FORTE und MITARB. (1973). Alle beschriebenen Methoden der Isolierung von Plasmamembranen haben den Nachteil, daß sie nur mit sehr großen Zellmengen auszuführen sind. Die Isolierungsmethoden sind überwiegend auf in vivo gewachsene Zellen zugeschnitten. Außerdem zeigten die beschriebenen Methoden nicht die für reine Plasmamembranfraktionen erforderlichen Reinheitskriterien. Als Reinheitskriterien kommen in Frage: Anreicherung von (Plasma-)membrangebundenen Enzymen, wie 5'-Nucleotidase, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ und der Ausschluß mitochondrialer Enzyme. Wertvolle Hinweise über eine vorhandene reine Plasmamembranfraktion liefern elektronenmikroskopische Untersuchungen.

Eine Plasmamembranfraktion zu erhalten, die möglichst frei von Verunreinigungen durch cytoplasmatisches Material oder Mitochondrienbruchstücke ist, war in der vorliegenden Arbeit von besonderer Wichtigkeit, zumal die Lipidzusammensetzung der Plasmamembranen (und nicht anderer Membranen) bestimmt werden sollte. Da für eine Plasmamembranisolierung aus in Monolayer-Kulturen gewach-

senen Zellen aus technischen Gründen nur 2×10^8 Zellen zur Verfügung standen und die Ausbeute (Membranprotein) etwa 1 - 2 % beträgt, mußte eine Methode der Plasmamembranisolierung gefunden werden, die auch bei der zur Verfügung stehenden Zellzahl ausreichend Membranmaterial lieferte.

Die Isolierungsmethoden von WARREN und MITARB. (1966), FORTE und MITARB. (1973) und BOONE und MITARB. (1969) wurden auf die unterschiedlichen Ansprüche hin zunächst getestet und miteinander verglichen. Dabei führte die " ZnCl_2 -Methode von WARREN und MITARB. (1966) nach erfolgter Homogenisation stets zu einer Verklumpung aller Zellbestandteile; deshalb war eine Abtrennung der Plasmamembranen zunächst mit unseren Zellen nicht möglich. Schwierigkeiten bestanden auch bei einer reproduzierbaren Bestimmung von Marker-Enzymen; diese Enzyme werden durch Zn-Bindung an funktionelle SH-Gruppen in ihrer Aktivität beeinträchtigt (Übersicht: WALLACH und LIN, 1973).

Besser geeignet erschien die Methode von FORTE und MITARB. (1973). Mit dieser Isolierungsmethode wurde eine Plasmamembranfraktion erhalten, die eine Anreicherung in der Aktivität der Marker-Enzyme wie $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ und 5'-Nucleotidase aufwies. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Abb. 16) zeigten jedoch keine homogene Plasmamembranfraktion. Aus diesem Grund wurde auch diese Methode als nicht ausreichend verworfen. Die Plasmamembranisolierung nach BOONE und MITARB. (1969) zeigte hingegen den besten Erfolg: die Methode ist aufwendiger als die oben aufgeführten Methoden, führte jedoch nach einigen Abwandlungen zu einer hochgereinigten Plasmamembranfraktion, in der keine Succinat-Dehydrogenase-Aktivität nachweisbar (Tab. 11) und mitochondriales Cardiolipin (Tab. 12) nur sehr geringfügig vorhanden war. Die Anreicherung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (Tab. 11) in der Plasmamembranfraktion entsprach den Angaben von BOONE und MITARB. (1969).

Lipide der Plasmamembranen

Die Lipidzusammensetzung der Plasmamembranen unterschied sich deutlich von der Lipidzusammensetzung der Gesamtzellen. So war das Fehlen von Cholesterinestern, Triglyceriden, Monoglyceriden und der geringe Anteil an Cardiolipin charakteristisch bei diesen isolierten Plasmamembranen (Tab. 12). Andererseits wiesen WOOD und MITARB. (1970) in Plasmamembranfraktionen von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen Triglyceride und Cholesterinester nach; es fehlte der Arbeit von WOOD und MITARB. jedoch die Angabe biochemischer Reinheitskriterien, und auf Grund elektronenmikroskopischer Aufnahmen dieser Autoren ist es wahrscheinlich, daß die Fraktionen nicht frei von cytoplasmatischen Verunreinigungen waren. Plasmamembranen von EG-65-Zellen unterschieden sich von den Membranen der ED-0,15-Zellen im erhöhten Gehalt an Gesamtlipid (Tab. 12), im erhöhten relativen Cholesterin-Gehalt und in einem erniedrigten Gesamt-Phospholipid-Gehalt, wobei letzteres auf den erniedrigten Gehalt an Phosphatidyläthanolamin zurückzuführen ist.

Die Plasmamembranfraktion von ED-0,35-Zellen ("NaCl-adaptierte Zellen") zeigten gegenüber der Plasmamembranfraktion der ED-0,15-Zellen einen erniedrigten Gehalt an Gesamtlipid (Tab. 12). Erniedrigt waren auch der Gehalt an Phosphatidyläthanolamin, Sphingomyelin und Inositolphosphatiden; erhöht gegenüber den Plasmamembranen von ED-0,15-Zellen waren Cholesterin und der Anteil an freien Fettsäuren.

Die Lipidzusammensetzung der Membranfraktion von ED-in vivo-Zellen unterschied sich nicht wesentlich von derjenigen von ED-0,15-Zellen (Tab. 12). So konnte eine leichte Erhöhung des Phospholipidgehalts gemessen werden, der Gehalt an Phosphatidyläthanolamin, Sphingomyelin und Inositolphosphatiden war leicht erhöht, der Phosphatidylcholin-Gehalt hingegen leicht erniedrigt.

Die prozentuale Verteilung der Fettsäuren nach saurer Methanolyse

des Gesamtlipids der Plasmamembranen (Tab. 14) ergab, daß unter den Fettsäuren der isolierten Gesamtlipide aus den Plasmamembranen aller untersuchten Ehrlich-Ascites-Tumorzellen überwiegend C_{18} -Körper vorhanden waren: bei ED-0,15-Zellen = 98 %, EG-65-Zellen = 88 %, ED-0,35-Zellen = 86 % und ED-in vivo-Zellen = 70 %.

Längerkettige, ein- bis mehrfach ungesättigte Fettsäuren (C_{20} , C_{22} , C_{24}) der Gesamtlipide von Plasmamembranen waren folgendermaßen verteilt: ED-in vivo-Zellen = 16 %, ED-0,35-Zellen = 13 %, EG-65-Zellen = 9 % und ED-0,15-Zellen weniger als 1 %.

Im Vergleich mit ED-0,15-Zellen sind in den Gesamtlipiden der Plasmamembranen von ED-in vivo-, EG-65- und ED-0,35-Zellen mehr längerkettige, ungesättigte Fettsäuren vorhanden. Die in vitro, in hypertonem NaCl- bzw. Glucose-Milieu gewachsenen ED-0,35- bzw. EG-65-Zellen unterscheiden sich somit deutlich im Gehalt an längerkettigen, ungesättigten Fettsäuren in den Gesamtlipiden der Plasmamembranen von den, in isotonem Medium gewachsenen, ED-0,15-Zellen.

Der höhere Anteil an ungesättigten Fettsäuren in den Gesamtlipiden der Plasmamembranen bedeutet, daß diese Membranen eine höhere Fluidität aufweisen. DEUTICKE (1972) und DE GIER und MITARB. (1968) fanden an Membransystemen eine gesteigerte Permeabilität für Anionen und Nicht-Elektrolyte bei einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Dieser Permeationsunterschied wurde darauf zurückgeführt, daß sich ungesättigte Fettsäuren in Lipidschichten auf Grund ihrer Struktur nicht so dicht aneinanderlegen können wie gesättigte (DEMEL, 1972). Es ist somit möglich, daß die Plasmamembranen von EG-65- und ED-0,35-Zellen eine vermehrte Permeabilität im Vergleich mit ED-0,15-Zellen für Glucose oder NaCl aufweisen; allerdings kann dies im Augenblick nur vermutet werden. Die vermehrte Synthese an längerkettigen, ungesättigten Fettsäuren in den Gesamtlipiden von Plasmamembranen von EG-65- und ED-0,35-Zellen könnte immerhin als "adaptiver

Mechanismus" der Zellen , verursacht durch das Wachstum in hypertoniem NaCl- bzw. hypertoniem Glucose-Milieu, verstanden werden. Wird eine erhöhte Permeabilität der Plasmamembranen von ED-0, 35-Zellen und EG-65-Zellen angenommen, so steht dies scheinbar im Widerspruch zu den ebenfalls gemessenen Befunden: dem erhöhten Cholesterin-Gehalt und dem erniedrigten Phospholipid-Gehalt in den Gesamtlipiden der Plasmamembranen von ED-0, 35-Zellen und EG-65-Zellen im Vergleich zu den Gesamtlipiden der Plasmamembranen von ED-0, 15-Zellen.

DE GIER und MITARB. (1968) und DEMEL (1972) hatten an künstlichen Phospholipid-Membransystemen festgestellt, daß die Permeabilität von Anionen und Nicht-Elektrolyten mit dem Verhältnis Cholesterin/Phospholipid korreliert. Cholesterin erhöht die Packungsdichte von Fettsäureketten (DEMEL, 1972) und vermindert somit die Permeabilität, Phospholipide vermindern die Packungsdichte und erhöhen die Permeabilität. Wird das Verhältnis Cholesterin/Phospholipid als Maß für die Permeabilität für Anionen und Nicht-Elektrolyte verwendet, so zeigt der niedrigste Quotient die höchste Permeabilität an. Unter der Voraussetzung, daß diese "in vitro Befunde mit künstlichen Membranen" auf die in-vivo-Verhältnisse der untersuchten Ehrlich-Ascites-Tumorzellen übertragen werden können, ergäbe sich folgende Abstufung hinsichtlich des Permeabilitätsquotienten (CH/PL): ED-0, 15-Zellen = 0,034, ED-0, 35-Zellen = 0,307, EG-65-Zellen = 0,703, ED-in vivo-Zellen = 1,0 . Während DE GIER und MITARB. (1968) an künstlichen Membransystemen eine verminderte Permeabilität bei steigendem Cholesterin-Gehalt nachwiesen, konnte DEUTICKE (1972) andererseits an Plasmamembranen von Erythrozyten keine veränderte Permeation für Anionen und Nicht-Elektrolyte bei steigendem Cholesterin-Gehalt und konstantem Phospholipid-Gehalt finden. Ob dieses veränderte Verhältnis CH/PL bei verschiedenen Ascites-Tumorzellmembranen einen Hinweis auf eine veränderte Permeation für NaCl oder Glucose andeutet, kann ebenfalls nur vermutet werden.

5. Zusammenfassung

Die Mechanismen, die einer Zelle Leben und Wachstum in einem hypertonen Milieu ermöglichen, sind ungeklärt. In dieser Arbeit wurde dieser Frage nachgegangen und untersucht, welche Veränderungen an Zellen auftreten, die in Gegenwart hypertoner NaCl- oder hypertoner Glucose-Konzentration wachsen. Es wurden Untersuchungen an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen durchgeführt, die in Langzeit-Monolayer-Kulturen sowohl in hypertonem Glucose-Milieu (EG-50- und EG-65-Zellen) als auch in hypertonem NaCl-Milieu (ED-0,35-Zellen) bzw. an Zellen, die in isotonem Milieu in Kultur (ED-0,15-Zellen) oder in vivo (ED-in vivo-Zellen), intraperitoneal in Mäusen, gezüchtet wurden.

Neben Bestimmungen der makromolekularen Zusammensetzung dieser Zellen (DNA-, RNA- und Protein-Gehalt) wurden analysiert:

- a) Aspekte des Energiestoffwechsels, wie zellulärer Sauerstoffverbrauch und Glykolyserate, Bestimmung der Aktivität glykolytischer Enzyme und der Aktivität von Enzymen des Pentosephosphatzyklus;
- b) die zellulären und extrazellulären Glycosaminoglycane (im Vorversuch);
- c) das Lipidmuster der Gesamtzellen bzw. der daraus isolierten Plasmamembranen;
- d) Membraneigenschaften, wie osmotische Fragilität.

Die Untersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse:

- 1) Der O_2 -Verbrauch von ED-in vivo-Zellen zeigt während der Inkubation in verschiedenen physiologischen Salzlösungen (Earles Salz, Tyrode, Locke, Tris 0,1 M, Ringer A und Ringer B (ohne Glucose-Zusatz)) keine wesentlichen Unterschiede. Er betrug etwa $2,6 \mu l O_2 / 10^6$ lebende Zellen.
- 2) Eine leichte Erhöhung (5 - 10 %) des O_2 -Verbrauchs wurde bei Inkubation von ED-0,15- und ED-in vivo-Zellen in Eagles

Basalmedium festgestellt.

- 3) Gegenwart von Glucose, Mannose oder Fructose in Konzentrationen von 10 mg/ml in Earles Salz-Lösung bewirkt eine Hemmung des O_2 -Verbrauchs (Crabtree-Effekt) von ED-in vivo-Zellen. Die Hemmraten betrugen für Glucose = 25 %, für Mannose = 25 % und für Fructose 4 %. Nach einer Inkubationszeit von 1 Std betrug die Hemmung in Gegenwart dieser Zucker noch 11 %; nach etwa 2-stündiger Inkubation war keine Hemmung mehr vorhanden.
- 4) Saccharose in einer Konzentration von 20 mg/ml in Earles Salz-Lösung bewirkte während einstündiger Inkubation von ED-in vivo-Zellen eine Stimulierung der Atmung um etwa 10 %. Saccharose (40 - 100 mg/ml) in Earles Salz-Lösung stimulierte den zellulären O_2 -Verbrauch bis auf 70 %.
- 5) Die Abnahme des O_2 -Verbrauchs korreliert mit der Zunahme an trypanblau-gefärbten Zellen. Jedoch kann die Trypanblaufärbung nicht als absolutes Maß für den Zelltod angesehen werden; zumindest konnte im Fall von ED-in vivo-Zellen auch bei vollständiger Trypanblaufärbung noch ein O_2 -Verbrauch gemessen werden (40 %). Dieser O_2 -Verbrauch wird auf die vorhandenen Elektronentransportierenden Partikel zurückgeführt.
- 6) Höhere Glucose-Konzentrationen (50, 65, 75 und 100 mg/ml) im Kulturmedium wirkten sich hemmend auf die Wachstumsgeschwindigkeit von ED-in vivo-Zellen aus. 50 mg/ml Glucose im Kulturmedium bewirkte eine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit (gemessen an der Proteinzunahme pro Zeiteinheit) um 26 %.

- 7) Nach "Adaptation" des Wachstums von ED-0,15-Zellen an eine Glucose-Konzentration von 50 mg/ml (EG-50-Zellen) betrug die Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit etwa 50 %. Der Proteingehalt von EG-50-Zellen war, verglichen mit ED-0,15-Zellen (in isotonem Medium gewachsen), signifikant erhöht (114 %). Die DNA- und RNA-Gehalte von EG-50-Zellen waren im Vergleich mit den DNA- und RNA- Gehalten von ED-0,15-Zellen ebenfalls erhöht (DNA um 100 %, RNA um 80 %).
- 8) Der O_2 -Verbrauch ($\mu l O_2 / mg \text{ Protein} \times h$) von EG-50-Zellen, verglichen mit dem O_2 -Verbrauch von ED-0,15-Zellen, war um 20 % erhöht. Die Laktatproduktion pro Zeiteinheit war bei EG-50-Zellen nicht erhöht.
Auf Grund des erhöhten O_2 -Verbrauchs wurde ein erhöhter Energiestoffwechsel von EG-50-Zellen gegenüber ED-0,15-Zellen angenommen.
EG-65-Zellen zeigten, verglichen mit ED-0,15-Zellen, keinen erhöhten O_2 -Verbrauch; dies wurde auf eine stärkere Schädigung während der Aufarbeitung zurückgeführt.
- 9) "Glucose-adaptierte" Zellen (EG-65-Z.) metabolisieren Glucose vermehrt über den Pentosephosphatzyklus.
Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß EG-65-Zellen, verglichen mit ED-0,15-Zellen, eine erhöhte Aktivität von NADP-abhängigen Enzymen, wie Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Gluconsäure-6-Phosphat-Dehydrogenase aufwiesen; erhöht war bei EG-65-Zellen ebenfalls die Aktivität der extramitochondrialen, NADP-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase. Es war auffällig, daß bei "Glucose-adaptierten" Zellen nur diese NADP-abhängigen Enzyme erhöhte Aktivität aufwiesen, während glykolytische Enzyme (Aldolase, Hexokinase, Glycerinaldehyd-Phos-

phat-Dehydrogenase, Pyruvat-Kinase, u. a.) und Transaminasen (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase) von EG-65-Zellen ähnliche Aktivitäten wie diejenigen von ED-0, 15-Zellen aufwiesen.

Die erhöhte Aktivität NADP-abhängiger Enzyme von EG-65-Zellen wurde als Ausdruck für erhöhten NADPH-Verbrauch bei der Lipidsynthese gedeutet; dabei wurde, auf Grund der verlangsamten Wachstumsrate von EG-65-Zellen, ein größerer Bedarf an Ribose (aus dem Pentosephosphatzyklus) für die Nucleinsäuresynthese dieser Zellen ausgeschlossen.

- 10) "Glucose-adaptierte" (EG-65-) und "NaCl-adaptierte" (ED-0, 35-) Zellen zeigten im Vergleich mit ED-0, 15-Zellen intra- und extrazellulär einen erhöhten Einbau von ^{14}C -Glucosamin in Glycosaminoglycanfraktionen, die die elektrophoretische Eigenschaft von sulfatierten Glycosaminoglycanen (im Falle von EG-65-Zellen) und von Hyaluronsäure (im Falle von ED-0, 35-Zellen) aufwiesen.
- 11) Der Gesamtlipidgehalt von "Glucose-adaptierten" EG-65-Zellen war um 40 % erhöht (verglichen mit ED-0, 15-Zellen), wobei die Triglyceride um 60 % erhöht waren; relativ erniedrigt war der Gehalt an Cholesterinestern (um 50 %) und an Phospholipiden (um 12 %). Das Fettsäurespektrum der Gesamtlipide von ED-0, 15- und EG-65-Zellen ergab, daß EG-65-Zellen im Vergleich mit ED-0, 15-Zellen 25 % mehr längerkettige, ungesättigte Fettsäuren (C_{20} , C_{22} , C_{24}) aufwiesen.
Der erhöhte Lipidgehalt von EG-65-Zellen wurde auf eine erhöhte Syntheserate von Triglyceriden aus Glucose zurückgeführt.
- 12) Vergleichende Einwirkung hypotoner Medien auf ED-0, 15- und EG-65-Zellen und die Messung der dabei auftretenden Zell-

schädigung (über Änderung der Trypanblaufärbung und des zellulären O_2 -Verbrauchs) ergab eine relativ erhöhte Widerstandsfähigkeit von EG-65-Zellen. Dies wurde auf eine "stabilere" Plasmamembran dieser Zellen zurückgeführt.

- 13) Gereinigte Plasmamembranen aus ED-0,15-, ED-0,35-, ED-in vivo- und EG-65-Zellen enthielten in ihrem Gesamtlipid keine Cholesterinester, Triglyceride oder Monoglyceride; die Zusammensetzung der Gesamtlipide der Plasmamembranen unterscheidet sich somit deutlich von der Zusammensetzung der Gesamtlipide aus Gesamtzellen. Der Gesamtlipid-Gehalt (bezogen auf Membranprotein) von EG-65-Zellen war, im Vergleich mit ED-0,15-Zellen, um 24 % erhöht; Cholesterin war um 35 % erhöht, Phosphatidyläthanolamin um 66 % erniedrigt. Der Gesamtlipid-Gehalt der Plasmamembranen von ED-0,35-Zellen, bezogen auf das Membranprotein, war gegenüber ED-0,15-Zellen um 38 % erniedrigt; der Gehalt an Cholesterin im Vergleich zu ED-0,15-Zellen war um 50 % erhöht, Phosphatidyläthanolamin war um 30 % erniedrigt.

Die gaschromatographische Analyse des Fettsäurespektrums der Membranlipide ergab: 98 % aller Fettsäuren der Plasmamembranlipide von ED-0,15-Zellen sind C_{18} -Körper, nur 2 % kürzer- oder längerkettige (ungesättigte) Fettsäuren.

EG-65-Zellen enthielten im Gesamtlipid der Plasmamembranen 87 % C_{18} -Körper und 9 % längerkettige (C_{20} , C_{22} , C_{24}) Fettsäuren. ED-0,35-Zellen enthielten im Gesamtlipid der Plasmamembranen 86 % C_{18} -Fettsäuren und 13 % längerkettige (C_{20} , C_{22} , C_{24}) Fettsäuren.

Somit bewirkt der Langzeit-Einfluß eines hypertonen Glucose- und NaCl-Mediums eine Zunahme längerkettiger, ein- bis mehrfach ungesättigter Fettsäuren in den Plasmamembranlipiden.

6. Literaturverzeichnis

- ARNOLD, J. , 1887: Ueber Theilungsvorgänge an der Wanderzelle; ihre progressiven und regressiven Metamorphosen.
Arch. Mikrosk. Anat. 30, 205 - 310.
- BAILEY, J. M. , 1967: Cellular lipid nutrition and lipid transport.
Wistar Inst. Symp. Monogr. 6, 85 - 113.
- BAILEY, J. M. , G. O. GEY und M. K. GEY, 1959: The carbohydrate nutrition and metabolism of a strain of mammalian cells (MB III- strain of Mouse Lymphoblasts) growing in vitro.
J. Biol. Chem. 234, 1042 - 1047.
- BAUGH, C. C. , R. W. LECHER und A. A. TYTELL, 1967: The effect of pH on the propagation of the diploid cell WI-38 in galactose medium.
J. Cell Physiol. 70, 225 - 228.
- BAYREUTHER, K. , 1952: Der Chromosomenbestand des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus.
Z. Naturforschung 76, 554 - 557.
- BELITZER, W. A. , 1936: Über die umgekehrte Pasteursche Reaktion.
Biochem. Z. 283, 339 - 342.
- BERGMAYER, H. U. , 1970: Methoden der Enzymatischen Analyse, Herausgegeben von H. U. Bergmeyer, Band I - III, Verlag Chemie, Weinheim.
- BLOCH-FRANKENTHAL, L. und S. WEINHOUSE, 1959: Metabolism of neoplastic tissue. XII Effects of glucose concentration on respiration and glycolysis of Ascites Tumor Cells.
Cancer Res. 19, 1082 - 1090.
- BONTING, S. C. , K. A. SIMON und N. M. HAWKINS, 1961: Studies on Sodium-Potassium-Activated Adenosine Triphosphatase.
Arch. Biochem. Biophys. 95, 416 - 423.
- BOONE, CH. W. , L. E. FORD, H. E. BOND, D. C. STUART, D. LORENZ, 1969: Isolation of plasma membrane fragments from HeLa-Cells.
J. Cell Biol. 41, 378 - 392.
- BRADY, R. O. , C. BOREK und R. M. BRADLEY, 1969: Composition and synthesis of gangliosides in rat hepatocyte and hepatoma cell lines.
J. Biol. Chem. 244, 6552 - 6554.

- BRAY, G. A., 1960: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid-scintillator-counter.
Anal. Chem. 1, 279-285
- BRIN, M. und R. W. MC KEE, 1956: The inhibition of respiration by glucose, fructose and mannose in the Ehrlich Mouse Ascites Tumor.
Cancer Res. 16, 364 - 368.
- BUDDECKE, E., 1973: Grundriss der Biochemie, 3. Auflage,
Verlag W. de Gruyter, Berlin, New York.
- BURTON, K., 1955: The relation between the synthesis of Desoxyribonucleic Acid and the synthesis of protein in the multiplication of Bacteriophage T2.
Biochem. J. 61, 473 - 483.
- BYGRAVE, F. L., 1966: The effect of calcium ions on the glycolytic activity of Ehrlich Ascites Tumor Cells.
Biochem. J. 101, 480 - 487.
- CARREL, A. und M. T. BURROWS, 1911: On the physicochemical regulation of the growth of tissues. The effects of the dilution of the medium on the growth of the spleen.
J. Exp. Med. 13, 562 - 570.
- CERIOTTI, G., 1955: Determination of nucleic acids in animal tissues.
J. Biol. Chem. 214, 59 - 70.
- CHANCE, B. und B. HESS, 1956: On the control of metabolism in Ascites Tumor Cells-suspension.
Ann. N.Y. Acad. Sci 63, 1008 - 1016.
- CLARK, L. C., R. WOLF, D. GRANGER und Z. TAYLOR, 1953: Continues recording of blood oxygentoxic by polarography.
J. appl. Physiol. 6, 189 - 193.
- CLOWES, G. H. A. und A. K. KELTCH, 1954: Glucose, mannose and fructose metabolism by Ascites Tumor Cells: Effects of Dinitroresol.
Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 86, 629 - 634.

- COLOMBINI, M. und R. M. JOHNSTONE, 1973: Preparation and properties of the $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -ATPase of plasma membranes from Ehrlich Ascites Cells.
Biochim. Biophys. Acta 323, 69 - 86.
- COE, E. L. und W. V. V. GREENHOUSE, 1973: Possible regulatory interactions between compartmentalized glycolytic systems during initiation of glycolysis in Ascites Tumor Cells.
Biochim. Biophys. Acta 329, 171 - 182.
- CRABTREE, H. G., 1929: Observations on the carbohydrate metabolism of tumors.
Biochem. J. 23, 536 - 545.
- DE GIER, J., J. G. MANDERSLOOT, L. L. M. VAN DEENEN, 1968: Lipid composition and permeability of liposomes.
Biochim. Biophys. Acta 150, 666 - 675.
- DEMEL, R. A., W. S. M. GEURTS VAN KESSEL, L. L. M. VAN DEENEN, 1972: The properties of polyunsaturated lecithins in monolayers and liposomes and the interactions of these lecithins with cholesterol.
Biochim. Biophys. Acta 266, 26 - 40.
- DE PIERRE, J. W. und M. L. KARNOVSKY, 1973: Plasma membranes of mammalian cells. A review of methods for their characterization.
J. Cell Biology 56, 275 - 303.
- DICKENS, F., 1946: The toxic effects of oxygen on brain metabolism and on tissue enzymes.
Biochem. J. 40, 145 - 187.
- DICKENS, F. und G. D. GREVILLE, 1933: Metabolism of normal and tumour tissue. VIII Respiration in fructose and in sugar-free media.
Biochem. J. 27, 832 - 841.
- DINGLE, J. T. und M. WEBB, 1965: Mucopolysaccharide metabolism in tissue culture., in: Cells and Tissues in Culture, Herausg.: E. N. Willmer, Bd. 1.
Academic Press, London, New York.

- DIXON, K. C. und E. HOLMES, 1935: Mechanism of the Pasteur-Effect.
Nature 135, 995 - 996.
- DEUTICKE, B., 1972: Passive Transport-Mechanismen an der Erythrozyten-Membran.
Arzneim.-Forschung 22, 2043 - 2049.
- EAGLE, H., 1956: The salt requirements of mammalian cells in tissue culture.
Arch. Biochem. Biophys. 61, 356 - 366.
- EAGLE, H., 1955: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture.
Science 122, 501 - 504.
- EATON, M., D. SCALA und M. JEWELL, 1959: Methods for measuring viability of ascites cells. Dye exclusion and respiration as affected by depletion, poisons and viruses.
Cancer Res. 19, 945 - 953.
- EARLE, W. R., 1943: Production of malignancy in vitro. IV The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells.
J. Natl. Cancer Inst. 4, 165 - 212
- EDSTRÖM, R. D., 1969: A colorimetric method of determination of mucopolysaccharides and other acidic polymers.
Anal. Biochemistry 29, 421 - 432.
- EGGE, H., U. MURAWSKI, J. MÜLLER, F. ZILLIKEN, 1970: Mikro-lipidanalysen aus Serum mit dem Eppendorfsystem 2000.
Z. Klin. Chemie und Biochemie 5, 488 - 491.
- EGGE, H., D. SCHACHTSCHABEL und F. ZILLIKEN, 1972: Changes in lipid composition of Ehrlich Ascites Tumor Cells induced by cultivation in media with increased sodium chloride content.
FEBS Letters 24, 49 - 52.
- EL'TSINA, N. V. und I. F. SEITZ, 1951: Respiratory and glycolytic phosphorylation in Tumor Cells.
Doklady Akad. Nauk. S. S. S. R. 77, 653 - 656.
- FOLCH, J., M. LEES und G. H. SLOANE STANLEY, 1957: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.
J. Biol. Chem. 226, 497 - 509.

- FORTE, J. G., T. M. FORTE und E. HEINZ, 1973: Isolation of plasma membranes from Ehrlich Ascites Tumor Cells. Influence of Amino Acids on $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -ATPase and K^+ -stimulated Phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 298, 827 - 841.
- FRATANTONI, C. J., C. W. HALL und E. F. NEUFELD, 1968: The defect in Hurler's and Hunter's syndromes: Faulty degradation of Mucopolysaccharides. *Proc. Natl. Sci. U.S.* 60, 699 - 706.
- GATT, S. und E. RACKER, 1959: Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism I. Crabtree Effect in reconstructed systems. *J. Biol. Chem.* 234, 1015 - 1023.
- GERLACH, U. und W. HIBY, 1970: Methoden der Enzymatischen Analyse, Herausgegeben von H. U. Bergmeyer, Band I - III, Verlag Chemie, Weinheim.
- GORDON, E. E. und M. DE HARTOG, 1968: Valinomycin-stimulated glycolysis in Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Biochim. Biophys. Acta* 162, 220 - 229.
- GRAFF, S., H. MOSER, O. KASTNER, A. M. GRAFF und M. TANNENBAUM, 1965: The significance of glycolysis. *J. Nat. Cancer Inst.* 34, 511 - 519.
- GREEN, D. E., S. MII und P. M. KOHOUT, 1955: Studies on the terminal electron transport system I. Succinic-Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 217, 551 - 577.
- GREENHOUSE, W. V. V. und E. L. COE, 1973: The effect of Potassium depletion on the initial kinetics of glycolysis in Ascites Tumor Cells. *Biochim. Biophys. Acta* 329, 183 - 195.
- GREGG, C. T., 1972: Some Aspects of the energy metabolism of mammalian cells. in: Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture, Ed. by G. H. Rothblat, V. J. Cristofolo, Vol. I, Academic Press.

- GREGG, C. T., J. M. MACHINIST und W. D. CURRIE, 1968: Glycolytic and respiratory properties of intact mammalian cells. Inhibitor studies.
Arch. Biochem. Biophys. 127, 101 - 111.
- GROSSFIELD, H., 1961: Production of hyaluronic acid by fibroblasts growing from explants of Walker Tumor 256.
J. Nat. Cancer Inst. 27, 543.
- HAMERMAN, D., G. J. TODARO und H. GREEN, 1965: The production of hyaluronate by spontaneously established cell lines and viral-transformed lines of fibroblastic origin.
Biochim. Biophys. Acta 101, 343 - 351.
- HAKOMORI, S. I. und W. T. MURAKAMI, 1968: Glycolipids of hamster fibroblasts and derived malignant-transformed cell lines.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 59, 254 - 261.
- HARRIS, M. und KUTSKY, R., 1953: Utilization of added sugar by chick heart fibroblasts in dialysed media.
J. Col. Comp. Physiol. 42, 449 - 470.
- HARRISON, R. G., 1906 - 1907: Observations on the living developing nerve fiber.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 4, 140 - 143.
- HARRISON, R. G., 1908: Embryonic transplantation and development of the nervous system.
Anat. Rec. 2, 385 - 410.
- HATANAKA, M., G. J. TODARO und R. V. GILDEN, 1970: Altered glucose transport kinetics in murine sarcoma virus-transformed BALB/3T3 clones.
Inst. J. Cancer 5, 224 - 228.
- HENDIL, K. B. und E. K. HOFFMANN, 1974: Cell volume regulation in Ehrlich Ascites Tumor Cells.
J. of Cell Physiol. 84, 115 - 126.
- HESS, B. und B. CHANCE, 1961: Metabolic control mechanisms. VI. Chemical events after glucose addition to Ascites Tumor Cells.
Ibid. 236, 239 - 246.
- HOHORST, H. J., 1970: in: Methoden der Enzymatischen Analyse, Herausgeber: H. U. Bergmeyer, S. 1425 - 1429, Verlag Chemie, Weinheim.
- IBSEN, K. H., 1961: The Crabtree effect: a review.
Cancer Res. 21, 829 - 841.

- IBSEN, K. H. , E. L. COE und R. W. MC KEE, 1958: Interrelationships of metabolic pathways in the Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. I. Glycolysis and respiration (Crabtree effect).
Biochim. Biophys. Acta 30, 384 - 400.
- IBSEN, K. H. , COE, E. L. und R. W. MC KEE, 1960: Some factors influencing respiration and glycolysis in Ehrlich Ascites Tumor Cells.
Cancer Res. 20, 1399 - 1407.
- JAYARAMAN, J. , C. COTUNEN und H. R. Makler, 1966: Biochemical correlates of respiratory deficiency VII glucose repression.
Arch. Biochem. Biophys. 116, 224 - 251.
- JONES, M. und S. L. BONTING, 1956: Some relations between growth and carbohydrate metabolism in tissue cells.
Exptl. Cell Res. 10, 631.
- KITOS, P. A. und C. WAYMOUTH, 1964: Glucose metabolism by mouse cells (NCTC clone 929) under conditions of defined nutrition.
Exper. Cell. Res. 35, 108 - 118.
- KLINGENBERG, M. , 1964: in: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse , Herausgeber: Hoppe-Seyler/Thierenfelder, Bd. VI A, S. 340 - 348.
Springer-Verlag, Berlin.
- KOHEN, E. , SCHACHTSCHABEL, D, KOHEN, C. und THORELL, B. , 1974: Microfluorometric study of metabolic alterations in Ehrlich Ascites Tumor following serial cultivations in hypertonic media.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 451 - 458.
- KOOPS, D. H. , 1972: Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects.
Science 178, 127 - 133.
- KOVACEVIC, Z. und H. P. MORRIS, 1972: The role of Glucosamin in the oxidative metabolism of malignant cells.
Cancer Res. 32, 326 - 333.
- KRAUSE, H. P. , 1973: Untersuchungen über die Bedeutung von Atmung und Glykolyse für Zellvermehrung und Energiestoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Dissertation, Marburg 1973.
- KÜRSCHNER, E. , 1971: Biochemische Untersuchungen über den Einfluß hypertoner Nährmedien auf das Wachstum und den Stoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Langzeit-Kultur.
Dissertation, Marburg 1971.

- KUN, E., P. TALALAY und H. G. WILLIAMS-ASHMAN, 1951: Studies on the Ehrlich Ascites Tumor. I. The enzymic and metabolic activities of the Ascites Cells and the Ascites Plasma.
Cancer Res. 11, 855 - 863.
- LEISS, O., 1974: Einfluß von Sojabohnenlecithin auf ATPase-Aktivität, Leucin- und Thymidin-Einbau, Lipidspektrum und carcinogene Eigenschaften von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Zellkultur.
Dissertation, Marburg 1974.
- LEVINSON, CH., 1970: Steady-state distribution of phosphate across the membrane of Ehrlich Ascites Tumor Cells.
Biochim. Biophys. Acta 203, 317 - 325.
- LEVINSON, CH. und H. G. HEMPLING, 1967: The role of ion transport in the regulation of respiration in the Ehrlich Ascites Tumor Cell.
Biochim. Biophys. Acta 135, 306 - 318.
- LEWIS, M. R. und W. H. LEWIS, 1911 a: The cultivation of tissues from chick embryos in solutions of NaCl, CaCl₂, KCl and NaHCO₃.
Anat. Rec. 5, 277 - 293.
- LEWIS, M. R. und W. H. LEWIS, 1911 b: On the growth of embryonic chick tissues in artificial media, nutrient agar and bouillon.
Bull. Johns Hopkins Hosp. 22, 126 - 127.
- LEWIS, M. R. und W. H. LEWIS, 1912: The cultivation of chick tissues in media of known chemical composition.
Anat. Rec. 6, 207 - 211.
- LIPMANN, F., 1933: Über die oxidative Hemmbarkeit der Glykolyse und den Mechanismus der Pasteurschen Reaktion.
Biochem. Z. 265, 133 - 140.
- LIPMANN, F., 1934: Über die Hemmung der Mazerationssaftgärung durch Sauerstoff in Gegenwart positiver Oxydoreduktionssysteme.
Biochem. Z. 268, 205 - 213.

- LOCKE, F. S., 1895 a: Artificial fluids as uninjurious as possible to animal tissues.
Boston Med. Surg. J. 134, 173.
- LOCKE, F. S., 1895 b: Towards the ideal artificial circulating fluid for the isolated frog's heart.
J. Physiol. (London) 18, 332 - 333.
- LOCKE, F. S., 1900: Die Wirkung der Metalle des Blutplasmas und verschiedener Zucker auf das isolierte Säugetierherz.
Zentralbl. Physiol. 14, 670.
- LOEB, L. und M. S. FLEISHER, 1919: The growth of tissues in the test tube under experimentally varied conditions with special reference to methodic cell proliferation.
J. Med. Res. 40, 509.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagents.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.
- MARKHAM, A. E. und K. A. KOBE, 1949: In: Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Herausgeber: J. D'Ans und E. Lax, 2. Auflage, S. 965.
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg .
- MC ILWAIN, H., 1946: The metabolism and functioning of vitamin-like compounds.
Biochem. J. 40, 67 - 78.
- MELANDER, Y., 1963: The role of a secondary constriction of a tumor chromosome.
Hereditas 49, 241 - 273.
- MICHL, J., 1971: Ernährung und Stoffwechsel gezüchteter Zellen.
In: Aktuelle Probleme der Zellzüchtung, Herausgeber: B. Mauersberger, S. 227 - 275.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- MOLNAR, J., G. MARKOVIC, H. CHAO und Z. MOLNAR, 1969: Glycoproteins of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. Separation of Plasma and endoplasmatic reticular membrane fragments.
Arch. Biochem. Biophys. 134, 524 - 532.

- MORA, P. T., R. O. BRADY, R. M. BRADLEY und V. W. MC FARLAND, 1969: Gangliosides in DNA-virus-transformed tumorigenic mouse cell lines.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 63, 1290 - 1296.
- MORGAN, J. F. und H. J. MORTON, 1960: Carbohydrate utilization by chick embryonic heart cultures.
Can. J. Biochem. Physiol. 38, 69 - 78.
- MORGAN, J. F. und C. F. ENG, 1970 :
J. Natl. Cancer Inst. 45, 869.
- NEUFELD, E. F. und M. CANTZ, 1973: The mucopolysaccharidoses studied in cell culture, in lysosomes and storage diseases
Herausgeber: H. G. Hers und F. van Hoof, S. 261 - 275.
Academic Press, N. Y., London.
- ORR, C. W. , YOSHIHAWA-FUKADA, J. D. EBERT, 1971: Potassium: Effect on DNA synthesis and multiplication of BHK Cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 243 - 247.
- PACKER, L. und R. H. GOLDBERGER, 1960: Correlation of structural and metabolic changes accompanying the addition of Carbohydrates to Ehrlich Ascites Tumor Cells.
J. Biol. Chem. 235, 1234 - 1240.
- PASTEUR, L., 1876: "Etudes sur la bière".
Gauthier-Villars, Paris.
- PAUL, J., 1965: Carbohydrate and energy metabolism. In : Cells and Tissues in Culture, Herausgeber: E. N. Willmer, Bd. 1, S. 239 - 276.
Academic Press N. Y., London.
- PIRT, S. J. und E. J. THACKERAY, 1964 a: Environmental influences on the growth of ERK mammalian cells in monolayer culture.
Exp. Cell Res. 33, 396 - 405.
- PIRT, S. J. und E. J. THACKERAY, 1964 b: Environmental influences on growth of L and ERK mammalian cells in shake-flask cultures.
Exp. Cell Res. 33, 406 - 412.
- POOLE, D. T., T. C. BUTLER und M. E. WILLIAMS, 1971: Effects of Valinomycin, Quabain and Potassium on glycolysis and intracellular pH of Ehrlich Ascites Tumor Cells.
J. Membrane Biol. 5, 261 - 276.
- RACKER, E., 1965: Mechanisms in Bioenergetics.
Academic Press N. Y., London.

- RACKER, E. , 1956: Carbohydrate metabolism in Ascites Tumor Cells .
Ann. N.Y. Acad. Sci. 63, 1017 - 1021.
- RAPOPORT, S. , H. G. SCHWEIGER und H. BRANDT, 1957: Zur Frage des endogenen Substrats und der Glukose-Hemmung der Atmung.
Die Naturwissenschaften 24, 636 - 637.
- RINGER, S. , 1880: Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle.
J. Physiol. (London) 3, 380 - 393.
- RINGER, S. , 1883 : A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the ventricular contraction.
J. Physiol. (London) 4, 222 - 225.
- RINGER, S. , 1886: Further experiments regarding the influence of small quantities of lime, potassium and other salts on muscular tissue.
J. Physiol. (London) 7, 291 - 308.
- RINGER, S. , 1895: Further observations regarding the antagonism between calcium salts and sodium, potassium and ammonium salts.
J. Physiol. (London) 18, 425 - 429.
- ROMEIS, B. , 1948: Mikroskopische Technik, 15. Aufl., S. 29 - 30.
Leibnitz Verlag, München.
- SCHACHTSCHABEL, D und J. J. FERRO. 1967: The effect of 4' - Aminopyrazolo(3, 4d)pyrimidine and guanine on Ehrlich ascites tumor cells in culture.
Exptl. Cell Res. 48, 319 - 326.
- SCHACHTSCHABEL, D. , 1969: Biochemische und cytologische Untersuchungen zum Stoffwechsel zur Teilung und Differenzierung von Zellen des Harding-Passey-Melanoms und Ehrlich-Ascites-Tumors in Zellkultur.
Habilitationsschrift zur Erlangung der venia legendi, Marburg 1969.

- SCHACHTSCHABEL, D. und H. EGGE, 1971: Changes in enzyme activities and lipid composition of Ehrlich ascites tumor cells following serial cultivation in media with increased NaCl content.
First European Biophysics Congress, 1971, Ed.: E. Broda, A. Locker, H. Springer, Lederer.
- SCHACHTSCHABEL, D. O., F. ZILLIKEN, M. SAITO und G. E. FOLEY, 1969: Inhibition of DNA synthesis and chromosome aberrations in cultured Ehrlich ascites tumor cells following treatment with luteoskyrin.
Exptl. Cell Res. 57, 19 - 28.
- SCHACHTSCHABEL, D. O. und G. E. FOLEY, 1972 : Serial cultivation of Ehrlich ascites tumor cells in hypertonic media.
Exptl. Cell Res. 70, 317 - 324.
- SCHACHTSCHABEL, D. O., 1972 : Increase in ATPase activity of Ehrlich ascites tumor cells following serial cultivation in media with increased (hypertonic) NaCl-content.
Z. Naturforschg. 27 b, 840 - 842.
- SCHACHTSCHABEL, D. O. und E. KÜRSCHNER, 1972: Macromolecular synthesis, glucose utilization and lactate production of Ehrlich ascites tumor cells serially cultivated in media with increased NaCl-concentration.
Exptl. Cell Res. 71, 338 - 344.
- SCHACHTSCHABEL, D. O., J. JOOKTATAT und C. HIRSCHHÄUSER, 1974: Changes in enzyme pattern of Ehrlich ascites tumor cells following serial cultivation in media with increased (hypertonic) NaCl-content.
Biochim. Biophys. Acta 381, 242 - 247.
- SCHÖN, R. und K. -H. MENKE, 1967: Isolierung und enzymatische Eigenschaften der Zellmembran von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Acta Biol. Med. German. 18, 43 - 55.
- SCHOLNICK, P., D. LANG und E. RACKER, 1973: Regulatory mechanisms of carbohydrate metabolism. IX. Stimulation of aerobic glycolysis by energy-linked ion transport and inhibition by dextran-sulfate.
J. Biol. Chem. 248, 5175 - 5182.

- SCHUNCK, R., 1973: Isolierung und Analyse des Myelins aus dem corpus callosum der erwachsenen Katze.
Dissertation, Marburg, 1973.
- SEELICH, F., W. WEIGERT und K. LETNANSKI, 1956: Über die endogene Atmung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und deren Beeinflussung durch Glucose und Fructose.
Z. Krebsforsch. 61, 368 - 375.
- SPECTOR, A. A. und D. STEINBERG, 1967: Relationship between fatty acids and glucose utilization in Ehrlich Ascites Tumor Cells.
J. Lipid Res. 7, 657 - 663.
- SUZUKI, S., K. KOJIMA und K. R. UTSUMI, 1970: Production of sulfated mucopolysaccharides by established cell lines of fibroblastic and nonfibroblastic origin.
Biochim. Biophys. Acta 222, 240 - 243.
- STUBBLEFIELD, E. und G. C. MUELLER, 1960: Effects of sodium chloride concentration on growth, biochemical composition and metabolism of HeLa cells.
Cancer Res. 20, 1646.
- TYRODE, M. V., 1910: The mode of action of some purgative salts.
Arch. Inst. Physicodyn. Ther. 20, 205 - 223.
- WALLACH, D. F. H. und ULLREY, 1962: Studies on the surface and cytoplasmic membranes of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells.
Biochim. Biophys. Acta 64, 526 - 539.
- WALLACH, D. F. H. und P. S. LIN, 1973: A critical evaluation of plasma membrane fractionation.
Biochim. Biophys. Acta 300, 211 - 254.
- WARBURG, O., 1926 a: Über die Wirkung von Blausäureäthylester (Äthylcarbylamin) auf die Pasteursche Reaktion.
Biochem. Z. 172, 432 - 441.
- WARBURG, O., 1926 b: Über den Stoffwechsel der Tumoren.
Springer Verlag, Berlin.
- WARBURG, O., 1930: "The Metabolism of Tumours".
Constable, London, S. 236.
- WARBURG, O. und W. CHRISTIAN, 1936: Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten. (Pyridin-Nucleotide).
Biochem. Z. 287, 291.

- WARREN, L., M. GLICK and K. M. NASS, 1966: Methods of isolation of the surface membrane.
J. Cell. Physiol. 68, 269 - 288.
- WAYMOUTH, C., 1965: Construction and use of synthetic media.
In: Cells and Tissues in Culture.
Vol. 1., Academic Press N. Y., London, S. 99.
- WHITFIELD, J. F., A. D. PERRIS und T. YOUNDALE, 1968: The role of calcium in the mitotic stimulation of rat thymocytes by detergents, agmatine and poly-L-lysine.
Exptl. Cell Res. 53, 155 - 165.
- WILLIAMSON, J. R., 1965: Metabolic control in the perfused rat heart.
In: "Control of Energy Metabolism". Herausgeber: B. Chance, R. W. Estabrook und J. R. Williamson
Academic Press N. Y., London, S. 333 - 346.
- WOOD, R., N. G. ANDERSON und D. L. SWARTZENDRUBER, 1970: Tumor lipids: Characterization of the lipids isolated from membraneous material.
Arch. Biochem. Biophys. 141, 190 - 197.
- WU, R., 1965: Control mechanisms of glycolysis in Ehrlich Ascites Tumor Cells.
J. Biol. Chem. 240, 2827 - 2832.
- WU, R. und E. RACKER, 1959 a: Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. IV Pasteur effect and Crabtree effect in Ascites Tumor Cells.
J. Biol. Chem. 234, 1036 - 1041.
- WU, R. und E. RACKER, 1959 b: Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. III Limiting factors in glycolysis of Ascites Tumor Cells.
J. Biol. Chem. 234, 1029 - 1035.
- YOUNG, D. P. und H. J. MORTON, 1970: Effect of Ca^{++} and Mg^{++} on morphology and growth pattern of L-M cells.
In Vitro 6, 224.
- ZWARTOUW, H. T. und J. C. N. WESTWOOD, 1958: Factors affecting growth and glycolysis in tissue culture.
Brit. J. Exper. Path. 39, 529.

LEBENS LAUF

31. 12. 44	geboren in Olschan/Olmütz als Sohn von Arnold Manske und seiner Ehe- frau Erika, geb. Rösner
1951 - 1955	Besuch der Grundschule in Midlum/Wesermünde
1955 - 1957	Besuch der Realschule in Dorum/Wesermünde
1957 - 1965	Besuch von Gymnasien in Bremerhaven, Cux- haven und Stade/Elbe
1965	Abitur in Stade/Elbe
1965 - 1967	Bundeswehrdienst in Hildesheim
1967 - 1972	Studium der Biologie an der Technischen Universität Hannover
Dezember 1971	Diplom-Hauptprüfung
Januar 1972 - September 1972	Diplomarbeit am Botanischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter Anleitung von Priv. Doz. Dr. H. Strotmann über Ioneneinflüsse auf die Photosynthese
Seit Oktober 1972	beschäftigt am Physiologisch-chemischen Institut II der Philipps-Universität Marburg
Januar 1973 - August 1975	Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. D. Schachtschabel über den Einfluß hypertoner Medien auf Wachstum, Energie- und Lipid- stoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumor- zellen

